

MARIA DO CARMO DEBUR

**METAPNEUMOVIRUS HUMANO: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E
ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES
HOSPITALIZADOS E AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA
DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Área de concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profª Drª Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2010



PARECER

Aos dezessete dias do mês de agosto do ano de dois mil e dez, a banca examinadora constituída pelas Professoras Dra. Clarisse Martins Machado, Dra. Cristina Rodrigues da Cruz e a orientadora Dra. Sônia Mara Raboni, exarou o presente parecer sobre a Dissertação elaborada por Maria do Carmo Debur, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde- Mestrado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: : **“METAPNEUMOVIRUS HUMANO: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS E AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008”** A Banca Examinadora considerou que Maria do Carmo Debur apresentou trabalho adequado para Dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de *Mestre em Ciências da Saúde* e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 17 de agosto de 2010.


Dra. Clarisse Martins Machado


Dra. Cristina Rodrigues da Cruz


Dra. Sônia Mara Raboni

Aos meus pais, Dirce e Ildefonso, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado esposo Paulo Roberto pelo amor incondicional e incentivo na minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que estiveram presentes direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial:

A Deus, pela vida, saúde, fortalecimento, iluminação e proteção em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a Dr.^a Sônia Mara Raboni, pela sugestão do tema para a realização deste trabalho, pela oportunidade, confiança, incentivo, acompanhamento e ensinamento, sempre prestando uma orientação objetiva. Agradeço o seu exemplo, e por ter despertado em mim a curiosidade científica, além de ter proporcionado um inestimável crescimento técnico e científico.

Ao Dr. Juliano Bordignon, pelos ensinamentos, valiosas informações e sugestões dadas no projeto piloto deste trabalho, pela revisão dos textos.

A Dr.^a Cláudia Nunes Duarte dos Santos, por ter disponibilizado o seu laboratório para a produção do plasmídeo recombinante e seu seqüenciamento genético.

A Dr.^a Luine Rosele Vidal, Dr.^a Meri Bordignon Nogueira e Dr. Sérgio Monteiro de Almeida pela amizade, acompanhamento, importantes discussões técnico científicas, revisões dos artigos científicos enviados para publicação e confiança no desenvolvimento e divulgação desta pesquisa.

A Gislene Reche de Almeida Takahashi, Clyete Silveira, Luciane Aparecida Pereira, Indianara Rotta, Marcirene Andriow e Adelina Moraes pela amizade e apoio, possibilitando a realização deste trabalho.

A Elenice Stroparo pelo companheirismo e colaboração fundamental na extração das amostras e pelo esforço conjunto no levantamento dos dados.

A Dr.^a Sueli Massumi Nakatani, pelo exemplo e generosidade em compartilhar suas experiências laboratoriais. Agradeço o incentivo e a disponibilização dos equipamentos para que pudesse realizar o seqüenciamento genético do metapneumovirus humano.

A Irene Skraba, pelo apoio científico e doação das amostras coletadas dos pacientes ambulatoriais no ano de 2008.

A Dr.^a Crisitina Cruz, pelo precioso auxílio na elaboração dos formulários de coleta de dados dos pacientes analisados neste estudo.

A Dr.^a Adriana Delfraro, pelos ensinamentos de elaboração e análise das árvores filogenéticas.

A Dr.^a Cléa Elisa Lopes Ribeiro e Lilian Uratami, pela disponibilização dos dados dos prontuários eletrônicos dos pacientes que foram atendidos ambulatorialmente.

Ao SIMEPAR, pela disponibilização dos dados de temperatura e pluviosidade usados neste estudo.

As amigas Mayra Marinho Presibella Giacomini e Márcia Machado Ramos, por compartilhar os conhecimentos e experiências, além de sempre estarem presentes com uma palavra de incentivo.

Aos meus irmãos e familiares, pelo incentivo, apoio e carinho que me foi dado. E em especial, a minha irmã Marina de Fátima Debur Bernert, pela criteriosa leitura deste trabalho.

Maria do Carmo Debur

*“A possibilidade de realizarmos um sonho
é o que torna a vida interessante.”*

Paulo Coelho

RESUMO

O metapneumovirus humano (hMPV) é um membro da família *Paramyxoviridae* que foi descrito em 2001. O vírus tem sido associado com infecções respiratórias agudas (IRA) que variam desde o comprometimento do trato respiratório superior até formas graves de bronquiolite e pneumonia. O presente estudo teve como objetivos: padronizar um teste de RT-PCR para diagnóstico de rotina do hMPV; validar um controle positivo para esta metodologia; determinar a presença deste vírus em casos de IRA em pacientes hospitalizados e ambulatoriais na cidade de Curitiba - Sul do Brasil e descrever os dados clínicos desta infecção pelos diferentes subtipos de hMPV detectados. O estudo foi realizado retrospectivamente em 1.572 amostras de aspirado de nasofaringe, durante um período de três anos. O RNA foi extraído pelo método do tiocianato de guanidina e a RT-PCR realizada para amplificar um fragmento de 928pb do gene N do hMPV. O produto de PCR foi clonado, caracterizado e usado para padronizar a reação de RT-PCR. A subtipagem dos vírus detectados foi realizada por seqüenciamento genético. Os dados clínicos dos pacientes infectados foram obtidos dos prontuários médicos. Padronizou-se um teste de RT-PCR com um limite de detecção de 180 cópias/reação. O hMPV esteve presente em 61 (3,9%) amostras e os subtipos A1, A2a, B1 e B2 foram detectados entre os anos de 2006 a 2008. O vírus circulou durante todo o ano, sendo observada uma maior incidência em dois momentos: um no outono e outro no inverno e início da primavera. Co-infecções com outros vírus respiratórios foram observados em 16 (27,0%) casos. A prevalência do hMPV foi maior nos pacientes ambulatoriais (5,9%), cuja mediana de idade foi de 8,3 anos (variando de 6 meses a 75 anos), do que nos pacientes hospitalizados (4,1%), cuja mediana de idade foi de 4,8 meses (variando de 1 mês a 26 anos). Os pacientes atendidos em ambulatório desenvolveram infecção no trato respiratório superior, com sintomas gripais e todas as crianças hospitalizadas tiveram comprometimento no trato respiratório inferior. Um paciente pediátrico foi a óbito devido a complicações associadas à infecção pelo subtipo A2a do hMPV. Com esta pesquisa, observou-se que o hMPV foi detectado em pacientes com infecção respiratória de todas as faixas etárias. Diferentes subtipos do vírus podem circular no mesmo ano e nenhuma associação foi observada entre o subtipo viral e gravidade da infecção na população analisada.

Palavras-chave: Metapneumovirus humano. RT-PCR. Subtipos. Infecção respiratória. Pacientes hospitalizados. Pacientes ambulatoriais.

ABSTRACT

Human metapneumovirus (hMPV) is a member of the *Paramyxoviridae* family that was described in 2001. It has been reported as an important agent involved with acute respiratory infections (ARI) and may cause from upper respiratory tract infection to bronchiolitis and pneumonia. The present study was aimed to standardize a RT-PCR assay for routine hMPV diagnosis; validate a positive control for molecular tests; identify hMPV as the etiological agent of ARI in pediatric and HSCT hospitalized patients and outpatients in Curitiba city - Southern Brazil and describe clinical data of hMPV subtyping. The study was performed retrospectively in 1,572 respiratory samples over a period of three years. RNA was extracted by the guanidinium thiocyanate method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was performed to amplify a 928pb fragment of the hMPV N gene. The PCR product was cloned, characterized and used to standardize the RT-PCR assay. Subtyping was performed by nucleotide sequencing. Clinical data were obtained from medical records. It was standardized a RT-PCR assay with a detection threshold of 180 copies/reaction of NPA. hMPV was present in 61 (3.9%) samples and subtypes A1, A2a, B1 and B2 were detected between the years 2006 to 2008. hMPV circulated throughout the year with two annual picks, one in autumn and other in winter and spring. Viral co-infection was observed in 16 (27.0%) cases. The prevalence of hMPV was higher in outpatients (5.9%), whose mean age was 8.3 years (range 6 months to 75 years old), than in inpatients (4.1%), whose mean age was 4.8 months (range 1 month to 26 years old). The outpatients had upper respiratory tract infection, with flu like symptoms and all hospitalized children had lower respiratory tract infection. A pediatric patient died from complications associated with hMPV A2a infection. hMPV has been reported as a respiratory pathogen in all age groups. Different hMPV subtypes circulated in the same year, no association was observed between viral subtype and disease severity in this study.

Key words: Human metapneumovirus. RT-PCR. Subtypes. Respiratory infection. Hospitalized patients. Outpatients.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- ELETROMICROGRAFIA DAS PARTÍCULAS DE hMPV.....	23
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FRAGMENTOS DE DNA SEQUENCIADOS DO hMPV.....	25
FIGURA 3	- ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ORFs DO hMPV E MEMBROS DA SUBFAMÍLIA <i>PNEUMOVIRINAE</i>	26
FIGURA 4	- ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS NOVE VÍRUS ISOLADOS DA HOLANDA.....	27
FIGURA 5	- ESTRUTURA GENÔMICA DOS VÍRUS DA FAMÍLIA <i>PARAMYXOVIRIDAE</i>	29
FIGURA 6	- VÍRUS DE INTERESSE HUMANO DA FAMÍLIA <i>PARAMYXOVIRIDAE</i>	30
FIGURA 7	- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE UMA ÚNICA PARTÍCULA DE hMPV (a) DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UMA PARTÍCULA DE PNEUMOVIRUS (b).....	31
FIGURA 8	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO hMPV ISOLADO NL 00-1 (<i>Genbank</i> AF371337).....	33
FIGURA 9	- REGIÕES CONSENSO NO INÍCIO E FINAL DE CADA GENE DOS ISOLADOS CAN97-83 E CAN98-75.....	36
FIGURA 10	- ÁRVORE FILOGENÉTICA DO hMPV CONSTRUÍDA COM BASE NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE F (ORF POSIÇÕES 780 – 1221).....	37
FIGURA 11	- EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO EM CÉLULAS LLC-MK2 INFECTADAS POR hMPV.....	42
FIGURA 12	- PADRÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA NASOFARINGE INFECTADAS POR hMPV MARCADAS COM O ANTICORPO MONOCLONAL (Dako, Ely, Cambridgeshire, UK)	49
FIGURA 13	- SUBTIPAGEM DO hMPV UTILIZANDO O MÉTODO DE PCR-RFLP PARA O GENE F.....	51
FIGURA 14	- MAPA CIRCULAR DO VETOR <i>pGEM-T</i> (PROMEGA).....	61

FIGURA 15 - DETECÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA (N: 928pb) DO hMPV ATRAVÉS DA ANÁLISE DO GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO.....	70
FIGURA 16 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O PRODUTO DE RT-PCR (GENE N DO hMPV) APÓS A PURIFICAÇÃO COM O <i>HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT</i> (ROCHE INC., VALENCIA, CA).....	71
FIGURA 17 - GEL DE AGAROSE 1% CORADOS COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O RESULTADO DA REAÇÃO DE PCR ESPECÍFICA PARA O GENE N DO hMPV REALIZADA A PARTIR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS <i>E. COLI TOP 10F'</i> TRANSFORMADAS.....	71
FIGURA 18 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO ONDE SE VISUALIZA A DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>ECO R1</i> DO VETOR <i>PGEM-T EASY</i> CONTENDO O INSERTO DE 928pb DO GENE N DO hMPV.....	72
FIGURA 19 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA PARCIAL DO hMPV DETECTADO NO ANO 2000 EM CURITIBA E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO GENE N DO hMPV OBTIDAS NO <i>GENBANK</i>	73
FIGURA 20 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O LIMITE DE SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE PCR PARA hMPV UTILIZANDO UMA DILUIÇÃO SERIADA DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE....	74
FIGURA 21 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO QUE 500 CÓPIAS DO PRV ADICIONADO AO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO (BANDA DE 190pb) NÃO INIBE A DETECÇÃO DO GENE N DO hMPV..	75
FIGURA 22 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DE ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE PCR PARA hMPV UTILIZANDO AMOSTRAS POSITIVAS PARA OUTROS VÍRUS RESPIRATÓRIOS.....	75
FIGURA 23 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DE UMA AMOSTRA POSITIVA PARA hMPV (Nº 3397/06) COM O PROTOCOLO DESCRITO POR KAIDA <i>et al.</i> (2006) PARA DETECÇÃO DO GENE F.....	77

FIGURA 24 -	GEL DE AGAROSE 3% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO COM A GENOTIPAGEM DOS hMPV DETECTADOS PELA METODOLOGIA DE PCR-RFLP.....	78
FIGURA 25 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS PARCIAIS (156nt) DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA (N) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006-2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO <i>GENBANK</i>	82
FIGURA 26 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS PARCIAIS (220nt) DO GENE DA PROTEÍNA DE FUSÃO (F) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006-2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO <i>GENBANK</i>	83
FIGURA 27 -	ALINHAMENTO NUCLEOTÍDICO (A) E AMINOACÍDICO (B) COM O SOFTWARE <i>BIOEDIT VERSION 7.0.9.0</i> MOSTRANDO AS DIFERENÇAS ENCONTRADAS NAS SEQÜÊNCIAS PARCIAIS DO GENE F DO SUBTIPO B2 DE hMPV DETECTADOS NOS ANOS DE 2006 E 2007 EM CURITIBA.....	86
FIGURA 28 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS PARCIAIS (73aa) DA PROTEÍNA DE FUSÃO (F) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO <i>GENBANK</i>	87
FIGURA 29 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS PARCIAIS (52aa) DA NUCLEOPROTEÍNA (N) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO <i>GENBANK</i>	88
FIGURA 30 -	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ANF RECEBIDAS ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR PARA INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS.....	89
FIGURA 31 -	FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES ACOMETIDOS PELA INFECÇÃO DO hMPV POR UNIDADE CLÍNICA INVESTIGADA.....	91
FIGURA 32 -	FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS PELA INFECÇÃO DOS DIFERENTES	

	SUBTIPOS DE hMPV.....	95
FIGURA 33 -	FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES SUBMETIDOS À TCTH INFECTADOS PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV.....	99
FIGURA 34 -	FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES AMBULATORIAIS INFECTADOS PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV.....	101
FIGURA 35 -	SAZONALIDADE DO hMPV ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	SIMILARIDADE NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA ENTRE AS CEPAS ARGENTINAS DE hMPV.....	38
TABELA 2 -	SIMILARIDADE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS E NUCLEOTÍDICAS DO GENE F ENTRE AS AMOSTRAS DE hMPV DETECTADAS EM CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 E SEQÜÊNCIAS REFERÊNCIAS DEPOSITADAS NO <i>GENBANK</i>	80
TABELA 3 -	SIMILARIDADE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS E NUCLEOTÍDICAS DO GENE N ENTRE AS AMOSTRAS DE hMPV DETECTADAS EM CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 E SEQÜÊNCIAS REFERÊNCIAS DEPOSITADAS NO <i>GENBANK</i>	81
TABELA 4 -	RESULTADOS DA DETECÇÃO DO hMPV NAS AMOSTRAS DE ANF COLETADAS NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008, POR UNIDADES CLÍNICAS.....	93
TABELA 5 -	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV NOS PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS NO HC-UFPR ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008.....	97
TABELA 6 -	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV NOS PACIENTES AMBULATORIAIS DA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008.....	103
TABELA 7 -	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO hMPV EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DOS PACIENTES AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008.....	104

LISTA DE SIGLAS

aa	-	aminoácido
AdV	-	adenovírus
ANF	-	aspirado de nasofaringe
APV	-	metapneumovirus aviário
BAL	-	lavado broncoalveolar
bRSV	-	vírus sincicial respiratório bovino
cDNA	-	DNA complementar
CEF	-	fibroblastos embrionados de galinha
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	-	deoxinucleotídeos
DTT	-	dioetiltreitol
EIE	-	enzima imunoensaio
FAM	-	fluoróforo 6-carboxi fluoresceína
FLU A	-	vírus influenza A
FLU B	-	vírus influenza B
HBoV	-	bocavírus humano
HC-UFPR	-	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HEp-2	-	células de carcinoma de laringe
hMPV	-	metapneumovirus humano
hRSV	-	vírus sincicial respiratório humano
HRV	-	rinovírus humano
IFI	-	imunofluorescência indireta
Ig A	-	imunoglobulina A
Ig G	-	imunoglobulina G
INF- γ	-	interferon gama
IRA	-	infecção aguda do trato respiratório
kDa	-	quilo Dalton
LLC-MK2	-	células de rim de macaco <i>Rhesus</i>
M2-1	-	fator de transcrição
M2-2	-	fator de regulação e síntese de RNA

MDCK	- célula de rim de cão (<i>Madin Darby</i>)
mRNA	- RNA mensageiro
NASBA	- amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos
NS1	- Proteína não estrutural 1
NS2	- Proteína não estrutural 2
nt	- nucleotídeo
ORF	- fase aberta de leitura
pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	- reação em cadeia da polimerase seguida da análise do polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição
PIV1	- vírus parainfluenza humano tipo 1
PIV2	- vírus parainfluenza humano tipo 2
PIV3	- vírus parainfluenza humano tipo 3
PIV4A	- vírus parainfluenza humano tipo 4A
PIV4B	- vírus parainfluenza humano tipo 4B
pmol	- picomol
PRV	- <i>Pseudorabies virus</i>
PTA	ácido fosfotúngstico
RAP-PCR	- Reação em cadeia da polimerase com iniciadores randômicos
RNA	- ácido ribonucléico
RNP	- complexo ribonucleoprotéico
RPM	- rotação por minuto
RT-PCR	- transcrição reversa associada à reação de cadeia da polimerase
TBE	- tampão tris-borato-EDTA
TCID ₅₀	- dose infectante para 50% dos cultivos celulares
TCTH	- transplante de células tronco hematopoiéticas
tMK	- célula de rim de macaco terciário
TRTV	- vírus da rinotraqueíte de peru
UBS	- unidade básica de saúde
UTI	- unidade de terapia intensiva
VERO	- células de rim de macaco verde africano
VEV	- vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 A DESCOBERTA.....	22
2.1.1 Isolamento viral e caracterização	22
2.1.2 RAP-PCR	24
2.1.3 Análise Filogenética.....	25
2.1.4 Infecção experimental em aves e macacos <i>cynomolgus</i>	27
2.2 DESCRIÇÃO DO VÍRUS	28
2.2.1 Classificação.....	28
2.2.2 Estrutura viral.....	30
2.2.3 Organização genômica.....	32
2.2.4 Diversidade genética do hMPV.....	36
2.2.5 Replicação do hMPV	39
2.2.6 Replicação do hMPV <i>in vitro</i>	41
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR hMPV	42
2.3.1 Estudos soropidemiológicos	44
2.4 PATOGENIA DA INFECÇÃO POR hMPV	45
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR hMPV.....	46
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO hMPV	48
2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR hMPV	51
3 JUSTIFICATIVA.....	53
4 OBJETIVOS	54
4.1 OBJETIVO GERAL.....	54
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	55
5.2 AMOSTRAS	55
5.2.1 Critérios de inclusão	56
5.2.2 Critérios de exclusão	56
5.3 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	56
5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	57
5.4.1 Processamento das amostras	57

5.5	TRANSCRIÇÃO REVERSA ASSOCIADA À REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DO GENE N.....	58
5.5.1	Extração do RNA Viral.....	58
5.5.2	Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase	58
5.5.3	Detecção do Produto Amplificado.....	59
5.5.4	Validação de cada lote de extração e reação de RT-PCR para o gene N.....	60
5.6	PRODUÇÃO DE UM CONTROLE POSITIVO	60
5.7	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE RT-PCR PARA O GENE N DO hMPV..	63
5.8	ISOLAMENTO EM CULTURA CELULAR	63
5.8.1	Cultivo convencional.....	63
5.8.2	Cultivo pela metodologia da centrifugação rápida (<i>Shell vial</i>)	64
5.9	SUBTIPAGEM DO hMPV	65
5.9.1	Determinação dos subtipos do hMPV por meio da metodologia de PCR-RFLP	65
5.9.2	Determinação dos subtipos do hMPV por meio de seqüenciamento genético .	66
5.10	INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.....	68
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
6	RESULTADOS	70
6.1	PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR PARA O GENE N DO hMPV	70
6.2	SUBTIPAGEM DOS hMPV DETECTADOS	76
6.2.1	Subtipagem pela técnica de PCR-RFLP	77
6.2.2	Subtipagem pelo seqüenciamento genético	78
6.3	DETECÇÃO DO hMPV NAS AMOSTRAS ANALISADAS	88
6.4	CACTERÍSTICAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR hMPV ..	94
6.4.1	Pacientes hospitalizados no HC-UFPR com infecção por hMPV	94
6.4.1.1	Pacientes atendidos nas Unidades de Pediatria.....	94
6.4.1.2	Pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.	98
6.4.2	Pacientes ambulatoriais com infecção por hMPV	100
6.5	SAZONALIDADE DO hMPV	105
7	DISCUSSÃO	106
8	CONCLUSÃO	124
9	PERSPECTIVAS	125
	REFERÊNCIAS	126
	APÊNDICE	143
	ANEXO.....	192

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil e em outros países, infecção aguda do trato respiratório (IRA) é considerada como uma importante causa de morbidade e mortalidade (ALTO, 2004; BASTIEN *et al.*, 2003; KAHN *et al.*, 2006; LÓPEZ-HUERTAS *et al.*, 2005). Os vírus respiratórios têm sido freqüentemente descritos como agentes etiológicos envolvidos com IRA e figuram como responsáveis por uma percentagem considerável de óbitos em crianças (ALTO, 2004; COSTA *et al.*, 2006; PEIRIS *et al.*, 2003; STOCKTON *et al.*, 2002; TSUCHYIA *et al.*, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2002). Tsuchyia *et al.* (2005), em um estudo na cidade de Curitiba (PR), identificaram os vírus respiratórios: influenza A (FLU A), influenza B (FLU B), vírus sincicial respiratório humano (hRSV), adenovírus (AdV), parainfluenza vírus humano tipos 1, 2 e 3 (PIV1, 2 e 3), como agentes etiológicos em 30% das amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) de pacientes hospitalizados e atendidos em ambulatorios por infecção do trato respiratório. Entretanto, em uma grande percentagem destas amostras o agente etiológico permaneceu indefinido, conforme também descritos em outros estudos no Brasil (COSTA *et al.*, 2006; TOMAZELLI *et al.*, 2007). Em aproximadamente 50% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade em adultos e em 15 a 35% dos casos de bronquiolite e pneumonia em pacientes pediátricos, o agente etiológico permanece indefinido (HAMELIN & BOIVIN, 2004).

Avanços nas metodologias de biologia molecular contribuíram para um rápido reconhecimento e identificação de novos patógenos respiratórios emergentes (ALTO, 2004; KAHN, 2007). Em 2001 van den Hoogen *et al.* por meio da técnica de RAP-PCR (reação da cadeia da polimerase com iniciadores randômicos) descreveram pela primeira vez o metapneumovírus humano (hMPV), na Holanda. Com base nas características genômicas, morfológicas e bioquímicas o mesmo foi classificado na família *Paramyxoviridae*, gênero *Metapneumovirus*. Análises genômicas dos hMPV isolados identificaram dois principais genótipos A e B, com os subtipos A1, A2a, A2b, B1 e B2 (GRAY *et al.*, 2006a; HUCK *et al.*, 2006; ISHIGURO *et al.*, 2004).

Estudos sorológicos com amostras estocadas sugerem que o hMPV circula na população humana há mais de 50 anos (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001). Há

evidências que aos 5 anos de idade, 90% das crianças já foram infectadas por este vírus (EBIHARA *et al.*, 2003; LEUNG *et al.*, 2005; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; WOLF *et al.*, 2003).

Desde a sua primeira descrição, o hMPV tem sido relatado em muitos países de todos os continentes e associado a doenças respiratórias (BASTIEN *et al.*, 2003; CUEVAS *et al.*, 2003; DEBUR *et al.*, 2007; EBIHARA *et al.*, 2003; ESPER *et al.*, 2003; FREYMOUTH *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2006a; HOWE, 2002; MADHI *et al.*, 2003; MAGGI *et al.*, 2003; MIRAZO *et al.*, 2005; PEIRIS, 2003). As características da infecção por este vírus incluem um comprometimento respiratório principalmente em crianças, idosos e imunossuprimidos (BOVIN *et al.*, 2002; STOCKTON *et al.*, 2002; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004b), com sinais e sintomas indistinguíveis daqueles associados a outros vírus respiratórios, podendo causar desde uma infecção no trato respiratório superior até bronquiolite e pneumonia (BOIVIN *et al.*, 2002; KÖNIG *et al.*, 2004; MAGGI *et al.*, 2003).

Métodos laboratoriais comumente utilizados para o diagnóstico viral, como o cultivo celular e a identificação do antígeno do vírus, por imunofluorescência direta e/ou indireta e ensaios imunoenzimáticos, têm demonstrado baixa sensibilidade e especificidade para detectar o hMPV. Assim sendo, diagnósticos moleculares, como RT-PCR (transcrição reversa associada à reação de cadeia da polimerase), têm sido a primeira escolha para detectar este vírus (CALICÓ *et al.*, 2009; MACKAY *et al.*, 2003).

O diagnóstico laboratorial do hMPV permite determinar a incidência, os subtipos circulantes e a sazonalidade do vírus, bem como conhecer os dados demográficos e clínicos dos pacientes infectados. Tais informações podem orientar nas medidas de controle de disseminação do agente, principalmente em comunidades fechadas, como em hospitais e em escolas, além de proporcionar ao médico informações fundamentais que poderão orientar na conduta terapêutica frente a uma IRA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As infecções agudas do trato respiratório caracterizam-se por comprometerem pacientes de todas as idades, contribuindo com um alto índice de morbidade e mortalidade principalmente em indivíduos nas faixas etárias mais extremas (crianças e idosos) e pacientes imunossuprimidos (COYLE *et al.*, 2004; SHEK & LEE, 2003). Estas infecções são causadas por uma diversidade de microorganismos, sendo que os patógenos virais contam para a sua grande maioria (ALTO, 2004).

Os vírus respiratórios apresentam um papel importante na etiologia das pneumonias adquiridas na comunidade que ocorrem em adultos, sendo também os principais agentes envolvidos na exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica e da asma, que são responsáveis por significativo número de consultas clínicas e hospitalizações (DAUBIN *et al.*, 2006). Atualmente, observa-se um aumento do número de estudos realizados para a investigação destes agentes em pacientes adultos criticamente doentes (BOIVIN *et al.*, 2007; FALSEY *et al.*, 2003; HAMELIN *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2005b), no entanto, ainda são escassas as informações sobre estes patógenos na população brasileira.

Em pacientes pediátricos, as infecções por vírus respiratórios podem causar sérias complicações clínicas, como crupe, bronquiolite e pneumonias, as quais freqüentemente requerem hospitalização (SYRMIS *et al.*, 2004), resultando em um substancial custo para a família e para a sociedade (LAMBERT & ALLEN, 2008; QUAN, 2007). Estas infecções são responsáveis por 1 a 3% de mortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade em países industrializados e por 10 a 15% de óbitos em crianças de países em desenvolvimento (QUAN, 2007).

Pacientes imunossuprimidos freqüentemente são acometidos por infecções respiratórias virais. Geralmente nos pacientes submetidos a transplante de pulmão ou de células tronco hematopoiéticas, estes vírus causam infecções no trato respiratório superior, como na maioria da população, mas apresentam a tendência de progredir para infecção no trato respiratório inferior, causando principalmente pneumonia. A taxa de mortalidade por estas infecções pode chegar de 50 a 70% nestes indivíduos (MARTINO *et al.*, 2005).

No Brasil, alguns estudos realizados em diferentes áreas geográficas, têm revelado os agentes virais como a principal causa de IRA, principalmente em crianças, como demonstrado na cidade de Fortaleza (ARRUDA *et al.*, 1991), Rio de Janeiro (NASCIMENTO *et al.*, 1991), São Paulo (MYIAO *et al.*, 1999; THOMAZELLI *et al.*, 2007), Uberlândia (COSTA *et al.*, 2006) e Curitiba (TSUCHIYA *et al.*, 2005). Entretanto, informações sobre a incidência dos vírus em crianças de outras regiões ainda são escassas.

De acordo com levantamentos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná, durante os anos de 2006 a 2008, a média anual de pacientes internados em Curitiba, por doenças do aparelho respiratório foi de 13.400 pacientes, em diferentes faixas etárias, sendo a pneumonia com causa desconhecida, a doença de maior incidência. A percentagem anual de mortalidade proporcional foi de 4,84%, segundo dados levantados neste período (BRASIL, Sistema de Informações em Saúde, 2009).

Um estudo realizado no laboratório de virologia do Hospital de Clínicas da UFPR, no período de 2000 a 2003, em 1.621 amostras clínicas (aspirado de nasofaringe ou lavado broncoalveolar), demonstrou uma prevalência de vírus respiratórios de 26,8% nos pacientes ambulatoriais e 32,2% nos pacientes internados com IRA, sendo que 67,8% do total das amostras analisadas de pacientes hospitalizados com sintomatologia respiratória, tiveram o resultado negativo para os vírus rotineiramente testados no laboratório pela técnica de imunofluorescência indireta ou cultivo celular (TSUCHIYA *et al.*, 2005). Thomazelli *et al.* (2007) realizaram um estudo com 336 amostras do trato respiratório de crianças hospitalizadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo com infecção respiratória no ano de 2003. Vírus respiratórios - detectados pela RT-PCR seguida de análise com o *software GeneScan*[®] - foram responsáveis por 55,6% dos casos.

Os agentes etiológicos virais mais frequentemente envolvidos com as infecções do trato respiratório são os vírus FLUA, FLUB, AdV, hRSV, PIV 1, 2, 3, 4A e 4B, rinovírus humano (HRV), coronavírus humano (hCoV) e bocavírus humano (HBoV) (ALLANDER *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2006; FOX, 2007; KAHN *et al.*, 2007). Estes vírus são responsáveis por um espectro de manifestações clínicas que incluem o comprometimento alto e baixo do trato respiratório (SYRMIS *et al.*, 2004). Contudo, os agentes causadores de uma significativa parcela das infecções respiratórias ainda são desconhecidos (ALTO *et al.*, 2004).

Tal observação tem levado a pesquisa constante de novos patógenos envolvidos com estas infecções. Dentre estes estudos destaca-se o realizado em 2001 por van den Hoogen *et al.*, na Holanda, que culminou com a descrição de um novo vírus respiratório, o metapneumovirus humano (hMPV).

2.1 A DESCOBERTA

2.1.1 Isolamento viral e caracterização

Em junho de 2001, pesquisadores do Departamento de Virologia e Pediatria do Centro Médico Erasmus, em Rotterdam na Holanda, relataram por meio de um estudo retrospectivo, por um período de vinte anos, o isolamento de um novo vírus respiratório. O mesmo foi identificado em 28 amostras de ANF, coletadas nos meses de inverno, de crianças hospitalizadas com infecção respiratória. A maioria dos pacientes infectados tinha menos de 5 anos de idade e os sintomas clínicos foram similares aos da infecção causadas pelo hRSV, variando desde sintomas respiratórios alto, até crupe, bronquiolite e pneumonia, sendo freqüentemente acompanhado de febre, mialgia e vômito. Algumas destas crianças necessitaram de ventilação mecânica (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

O novo vírus isolado replicou lentamente em alguns tipos de linhagens celulares, como: tMK (célula de rim de macaco terciário), células VERO (células de rim de macaco verde africano) e células A549 (células de carcinoma de pulmão humano), sendo essa replicação dependente de tripsina. Não ocorreu replicação em MDCK (células de rim de cão *Madin Darby*) ou CEF (fibroblastos embrionados de galinha). Os efeitos citopáticos induzido por estes vírus foram praticamente indistinguíveis daqueles causados pelo hRSV, com formação característica de sincícios seguida de rápida ruptura interna das células e subsequente descolamento das células do tubo de cultura. As células usualmente mostraram efeito citopático em 10-14 dias após a inoculação, ou seja, mais tardio do que os causados pelo hRSV (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Os sobrenadantes das células tMK infectadas por este novo vírus foram analisados por microscopia eletrônica com contraste negativo e exibiram partículas pleomórficas de 150-600 nm com pequenas projeções no envelope de 13 a 17 nm (FIGURA 1). Não foi observado atividade de hemaglutinação quando testado o sobrenadante de cultura com hemácias de pato, galinha ou porco. Estas características sugeriram que este novo vírus fosse um membro da família *Paramyxoviridae* (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

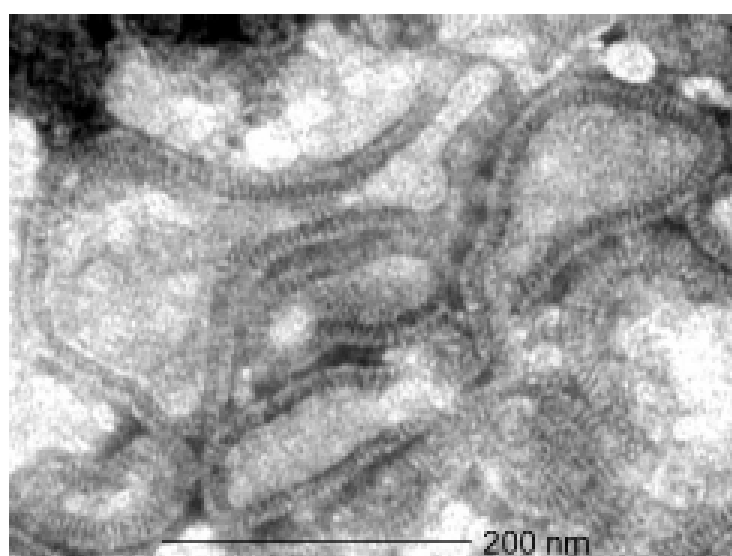


FIGURA 1 - ELETROMICROGRAFIA DAS PARTÍCULAS DE hMPV

FONTE: van den Hoogen *et al.* (2001)

NOTA: Sobrenadante das células tMK infectadas com o hMPV foram visualizadas por microscopia eletrônica com contraste negativo após coloração com PTA. Aumento: 92.000X.

A partir do sobrenadante das células tMK infectadas, extraiu-se o RNA (ácido ribonucleico) viral e realizou-se a RT-PCR com iniciadores específicos para os membros da família *Paramyxoviridae* conhecidos (PIV 1,2,3, e 4; hRSV; vírus da caxumba; vírus do sarampo; vírus da doença de Newcastle [NDV]; vírus Sendai; vírus sínio tipo 5 [SV-5]). A RT-PCR foi realizada em condições de baixa extrínseca de forma a detectar um vírus potencialmente relacionado aos membros já conhecidos desta família. Nestas reações foram utilizados RNAs de cada um dos vírus citados como controle positivo. Todos os controles foram detectados quando testados com os iniciadores específicos, no entanto, o novo vírus isolado não

amplificou, indicando que o mesmo não se relacionava com nenhum membro já conhecido dessa família (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Posteriormente, o sobrenadante das células tMK infectadas (sem purificação prévia) foi inoculado por via intranasal em porcos da Índia e furões com o intuito de que esses animais produzissem anticorpos vírus específicos. As cobaias não apresentaram qualquer sintoma clínico e os anticorpos produzidos não reagiram nos ensaios de imunofluorescência com células infectadas com painel de paramyxovírus e orthomyxovírus (PIV 1-4, hRSV, FLU A e FLU B). Posteriormente, as células tMK infectadas das 28 amostras positivas, foram testadas com os anticorpos dos porcos da Índia e dos furões antes e após a infecção, reagindo positivamente nos ensaios de imunofluorescência com os anticorpos produzidos pós-infecção, indicando que eles foram sorologicamente relacionados ou idênticos (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

2.1.2 RAP-PCR

A metodologia de Reação em cadeia da polimerase com iniciadores randômicos (RAP-PCR) foi utilizada para se obter informações das seqüências genômicas deste novo vírus. Foram seqüenciados vinte fragmentos genômicos específicos. Dez seqüências aminoacídicas foram semelhantes com as seqüências de APV/TRTV (metapneumovirus aviário [APV] ou vírus da rinotraqueíte de peru [TRTV]). Estes dez fragmentos foram localizados nos genes codificantes para nucleoproteína (N, fragmentos 1 e 2), proteína da matriz (M, fragmento 3), proteína de fusão (F, fragmentos 4, 5, 6 e 7) e a proteína polimerase (L, fragmentos 8, 9 e 10). Posteriormente foram desenhados iniciadores de forma que a reação de PCR completasse as seqüências faltantes do genoma viral, baseado nos fragmentos do RAP-PCR e seqüências da subfamília *Pneumovirinae* (FIGURA 2). No total foram gerados 5,7 kilobases de informação da seqüência genômica viral. Análises destas seqüências revelaram a ausência dos fragmentos NS1 e NS2 na extremidade 3' do genoma viral, sendo que o gene F estava imediatamente adjacente ao gene M. Esta organização genômica era semelhante ao do metapneumovirus aviário (APV), da

subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Metapneumovirus* (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

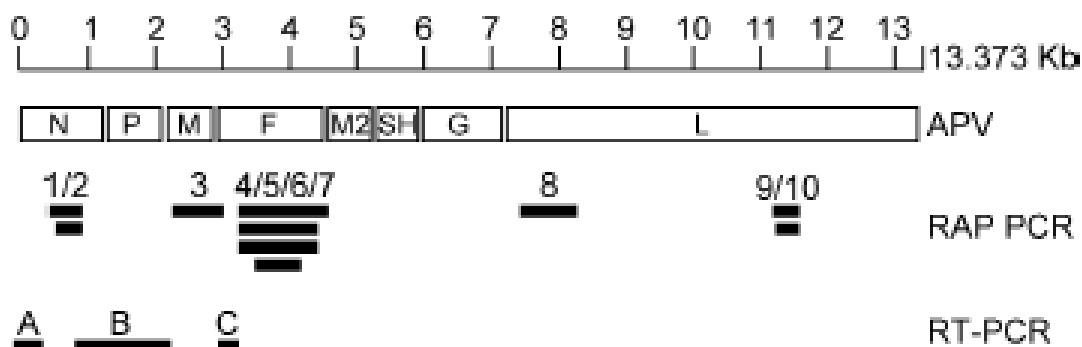


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FRAGMENTOS DE DNA SEQUENCIADOS DO hMPV

FONTE: Modificado de van den Hoogen *et al.* (2001)

NOTA: Um diagrama esquemático do APV (3'→5', esquerda para direita) é mostrado abaixo dos fragmentos obtidos com o RAP-PCR e RT-PCR com o isolado viral 00-1. Fragmentos 1-10 foram obtidos usando o RAP-PCR. Fragmento A foi obtido com o iniciador desenhado a partir dos fragmentos 1 e 2 do RAP-PCR e um iniciador desenhado com base no alinhamento com seqüências de APV. Fragmento B foi obtido com iniciadores desenhados a partir dos fragmentos 1, 2 e 3 do RAP-PCR. Fragmento C foi obtido com iniciadores desenhados a partir dos fragmentos 3-7 do RAP-PCR.

As seqüências traduzidas das fases abertas de leitura (ORF) N, P, M e F foram alinhadas com seqüências aminoacídicas de hRSV e APV. As seqüências aminoacídicas de N, P, M e F mostraram 20%, 25%, 37% e 32% de homologia com as seqüências do hRSV e 52%, 67%, 87% e 80% de homologia com as seqüências do APV, respectivamente (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

2.1.3 Análise Filogenética

De forma a determinar um indicador da similaridade entre o novo vírus identificado e membros da subfamília *Pneumovirinae*, árvores filogenéticas foram construídas baseadas nas ORFs N, P, M e F destes vírus. Em todas as árvores filogenéticas construídas o novo vírus isolado mostrou alta similaridade com o APV (FIGURA 3), principalmente com o sorotipo C (metapneumovírus encontrado principalmente em aves nos Estados Unidos) (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

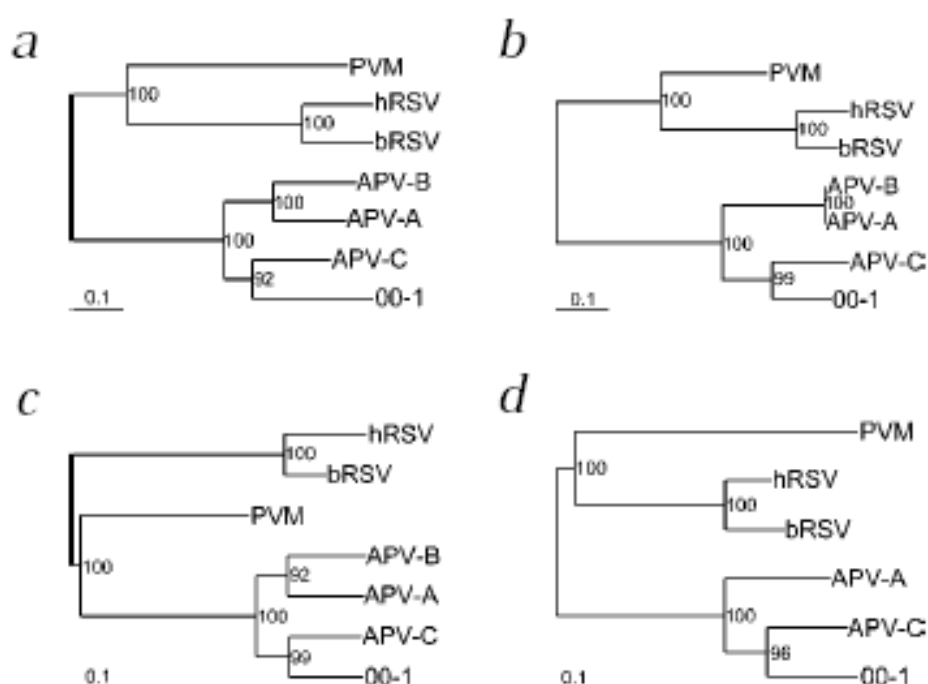


FIGURA 3 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ORFs DO hMPV E MEMBROS DA SUBFAMÍLIA *PNEUMOVIRINAE*

FONTE: Modificado de van den Hoogen *et al.* (2001)

NOTA: **a-d**: ORFs F (painel a), N (painel b), M (painel c) e P (painel d) do hMPV isolado 00-1 foram alinhadas com outros membros da subfamília *Pneumovirinae*. A árvore filogenética foi construída usando análise de probabilidade máxima com 100 *bootstraps* e 3 *jumbles*. A escala representa o número de modificações nucleotídicas. O valor de *bootstrap* baseou-se na árvore consenso.

Posteriormente, nove dos 28 vírus isolados foram amplificados por RT-PCR, seqüenciados e novas análises filogenéticas foram realizadas com pequenos fragmentos das ORFs N, M, F e L (71, 143, 142 e 102 nucleotídeos, respectivamente). Foram observados dois potenciais grupos genéticos nos vírus isolados na Holanda (FIGURA 4). O percentual de identidade das seqüências nucleotídicas do mesmo grupo foi de 90-100%, no entanto a identidade nucleotídica entre grupos diferentes foi de 81-88%. Estas variações foram semelhantes para os fragmentos N, M, F e L e não estava relacionado ao ano do isolamento do vírus (indicado nos dois primeiros números do nome do isolado) (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

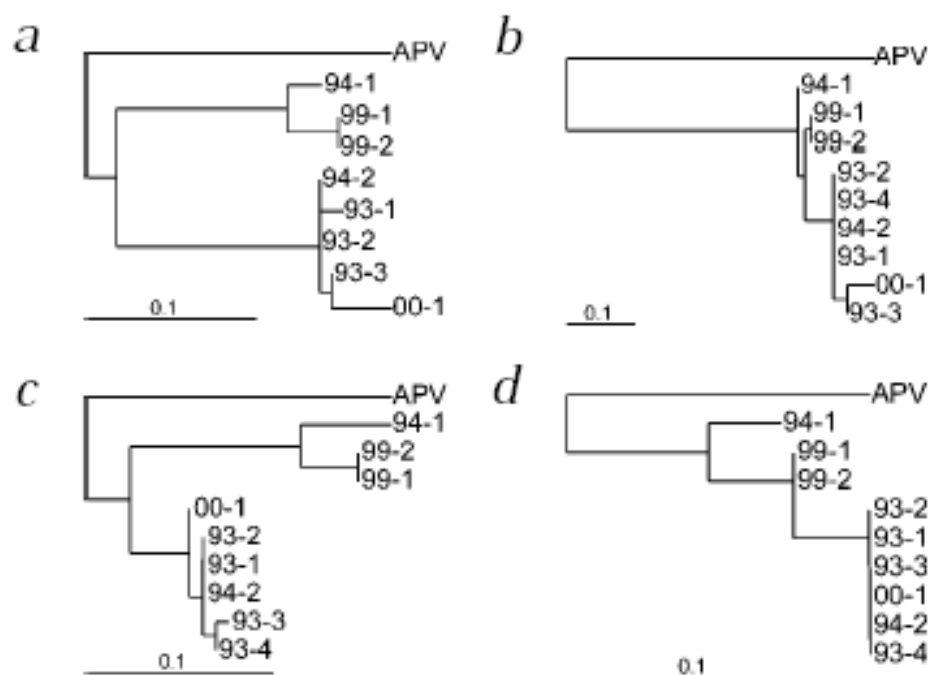


FIGURA 4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS NOVE VÍRUS ISOLADOS DA HOLANDA

FONTE: Modificado de van den Hoogen *et al.* (2001)

NOTA: **a-d**: ORFs parciais do F (painel **a**), N (painel **b**), M (painel **c**) e L (painel **d**). A árvore filogenética foi construída conforme descrito na Fig. 3. Os primeiros dois números do isolado indicam o ano da coleta. O fragmento F do isolado 93-4 não foi possível amplificar.

2.1.4 Infecção experimental em aves e macacos *cynomolgus*

Uma vez que o novo vírus isolado possuía similaridade com o APV, a pergunta que se fez foi se o novo vírus era um patógeno humano ou um patógeno aviário que pode também infectar humanos. Assim sendo, 4 patos, 4 galinhas e 4 macacos *cynomolgus* foram infectados na conjuntiva e no trato respiratório com 50.000 TCID₅₀ do novo vírus. Durante as 3 semanas seguintes, nenhuma ave apresentou sinais clínicos ou indícios de replicação viral, determinada por RT-PCR do RNA extraído do *swab* da cloaca e da goela. No entanto, o vírus replicou eficientemente no trato respiratório dos quatro macacos, conforme reação de RT-PCR do RNA isolado do *swab* da orofaringe. Dois macacos apresentaram sintomas de infecção do trato respiratório superior e análises histológicas provaram estar associado com rinite supurativa. Estes dados indicaram que o novo vírus tratava-se

de um patógeno associado com infecção respiratória em primatas (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Baseado nas análises anteriores e nesta experimentação, este vírus foi considerado o primeiro patógeno humano do gênero *Metapneumovirus* sendo denominado, portanto, como metapneumovirus humano (hMPV) (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Após esta primeira descrição, muitos estudos foram realizados sobre métodos diagnósticos, diversidade genética e epidemiologia, caracterizando as infecções por este vírus (BOIVIN *et al.*, 2002; CÔTÉ *et al.*, 2003; EBIHARA *et al.*, 2003; FALSEY *et al.*, 2003; HAMELIN & BOIVIN *et al.*, 2005; LEUNG *et al.*, 2005; LUDEWICK *et al.*, 2005; MACKAY *et al.*, 2003; MAERTZDORF *et al.*, 2004; PRINCIPI *et al.*, 2006).

2.2 DESCRIÇÃO DO VÍRUS

2.2.1 Classificação

Taxonomicamente, o hMPV foi classificado na família *Paramyxoviridae* (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

No ano de 2000, os membros desta família foram reclassificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus em duas subfamílias: *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae* (DOMACHOWSKE *et al.*, 2003). A subfamília *Paramyxovirinae* contém 5 gêneros: *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbilivirus*, *Respirovirus* e *Rubulavirus*. A subfamília *Pneumovirinae* contém 2 gêneros: *Pneumovirus* e *Metapneumovirus*. Esta classificação foi baseada em critérios morfológicos, organização do genoma viral, atividades biológicas das proteínas virais e as seqüências genômicas do RNA viral, em relação às proteínas codificadas (FAUQUET *et al.*, 2005).

A subfamília *Pneumovirinae* se distingue da subfamília *Paramyxovirinae* por inúmeros fatores:

- a) Seqüências aminoacídicas distantes, porém com semelhanças significativas nas proteínas F (fusão) e L (polimerase);

- b) *Pneumovirinae* codifica 8 a 10 mRNA, enquanto que a *Paramyxovirinae* 6 ou 7;
- c) *Pneumovirinae* codifica proteínas NS1 (proteína não estrutural 1), NS2 (proteína não estrutural 2), M2-1 (fator de transcrição) e M2-2 (fator de regulação e síntese de RNA) não encontradas na *Paramyxovirinae*, que por sua vez codificam as proteínas V (regulação da síntese de RNA), C (regulação da síntese de RNA) e D (função desconhecida) não encontradas na primeira;
- d) *Pneumovirinae* apresenta a glicoproteína de adesão (G) distinta estruturalmente das glicoproteínas hemaglutinina-neuraminidase (HN) e hemaglutinina (H) dos *Paramyxovirinae* (DOMACHOWSKE *et al.*, 2003).

Os gêneros da subfamília *Pneumovirinae* se diferem na ordem do aparecimento dos genes no genoma. O gênero *Metapneumovirus* não apresenta as proteínas não estruturais NS1 e NS2 e apresentam um posicionamento diferente entre os genes M e L (DOMACHOWSKE *et al.*, 2003), conforme demonstrado na Figura 5.

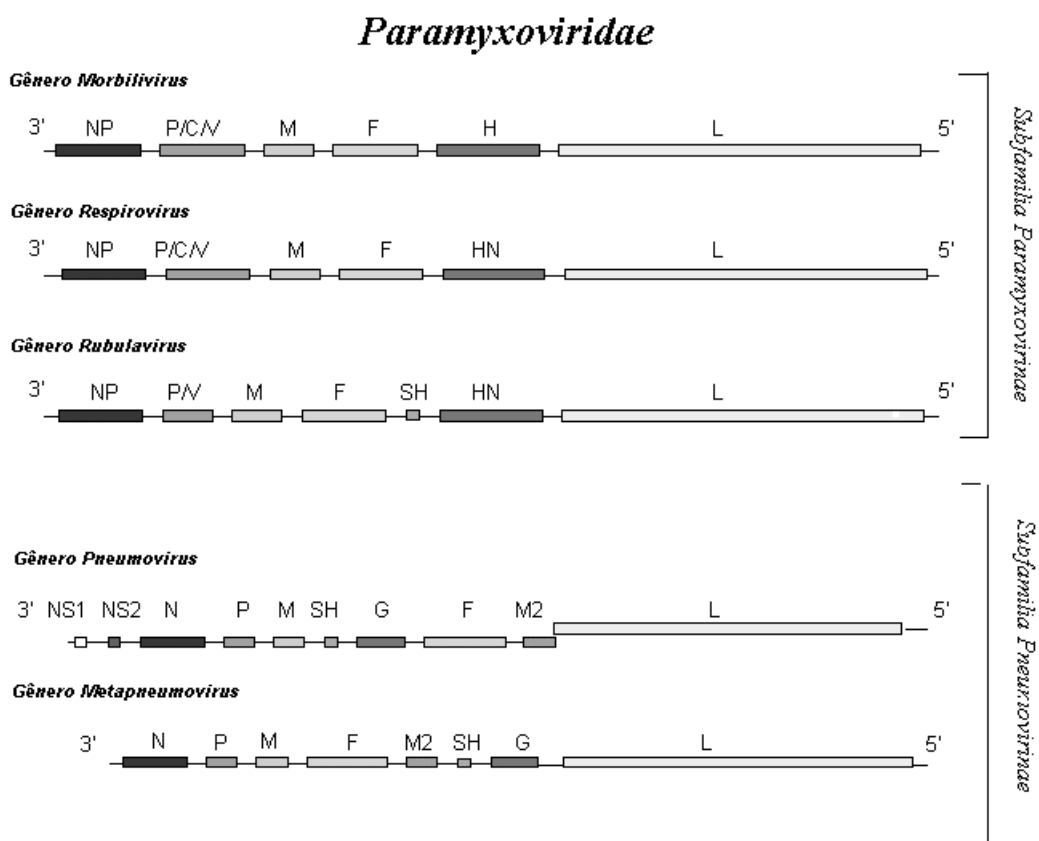


FIGURA 5 - ESTRUTURA GENÔMICA DOS VÍRUS DA FAMÍLIA PARAMYXOVIRIDAE
FONTE: Modificado de Easton *et al.* (2004)

Conforme descrito anteriormente, diversas características do hMPV levaram à classificação deste vírus no gênero *Metapneumovirus*, subfamília *Pneumovirus*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*: aspecto morfológico à microscopia eletrônica, ausência de atividade hemaglutinante, características sorológicas, organização do genoma e análises filogenéticas (PERET *et al.*, 2002; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002).

Antes da descrição do hMPV, o gênero *Metapneumovirus* era composto por apenas um membro, o metapneumovirus aviário, também conhecido como vírus da rinotraqueíte de peru, responsável por infecção do trato respiratório superior de pássaros (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Representantes da família *Paramyxoviridae*, principalmente os vírus envolvidos com infecção respiratória, estão relacionados na Figura 6.

Família <i>Paramyxoviridae</i>	Subfamília <i>Paramyxovirinae</i>	Gênero <i>Rubulavirus</i>	vírus parainfluenza humano tipos 2, 4a e 4b* vírus da caxumba
		Gênero <i>Respirovirus</i>	vírus parainfluenza humano tipos 1 e 3*
		Gênero <i>Morbilivirus</i>	vírus do sarampo
		Gênero <i>Henipavirus</i>	vírus nipah vírus hendra
	Subfamília <i>Pneumovirinae</i>	Gênero <i>Pneumovirus</i>	vírus sincicial respiratório*
		Gênero <i>Metapneumovirus</i>	metapneumovirus humano*

FIGURA 6 - VÍRUS DE INTERESSE HUMANO DA FAMÍLIA *PARAMYXOVIRIDAE*

FONTE: Modificado de Domachowske *et al.* (2003)

NOTA: *Vírus relacionados com infecção respiratória humana.

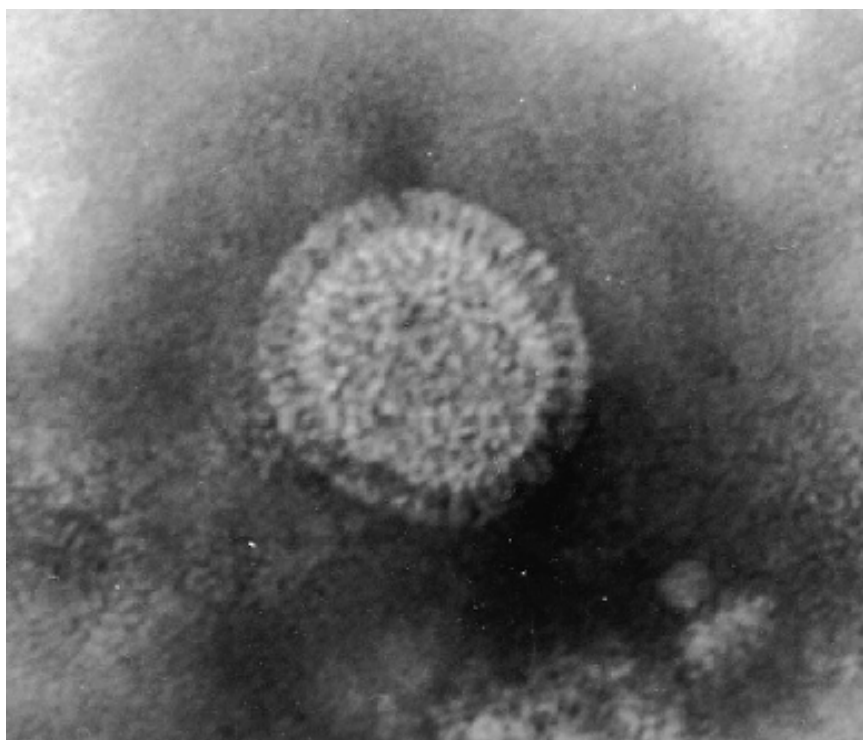
2.2.2 Estrutura viral

De acordo com a sua classificação, morfológicamente, o hMPV apresenta características em comum com outros membros da família *Paramyxoviridae*.

São partículas envelopadas esféricas (embora partículas filamentosas e pleomórficas também sejam observadas), com aproximadamente 200 nm de diâmetro e 150-600 nm de comprimento. Os vírions consistem de um envelope, um nucleocapsídeo e a proteína da matriz (KINGSBURY, 1991).

O genoma é constituído de uma fita simples de RNA, não segmentada, de polaridade negativa e com aproximadamente 13.350 nucleotídeos (BIACCHESSI *et al.*, 2003) que é envolto pelo nucleocapsídeo helicoidal. As proteínas que constituem o nucleocapsídeo são as nucleoproteínas (N), a fosfoproteína (P) e a polimerase (L). O nucleocapsídeo viral é envolto por um envelope lipídico, que apresenta espículas ou curtas projeções de 13-17 nm, espaçadas de 6-10 nm, que são derivados da membrana plasmática das células hospedeiras. No envelope viral estão inseridas as três glicoproteínas: glicoproteínas de adesão (G), de fusão (F) e pequenas proteínas hidrofóbicas (SH). A proteína da matriz (M) preenche o espaço entre o nucleocapsídeo viral e o envelope lipídico. (CASAS *et al.*, 2005; EASTON *et al.*, 2004; KINGSBURY, 1991; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001) (FIGURA 7).

a)



b)

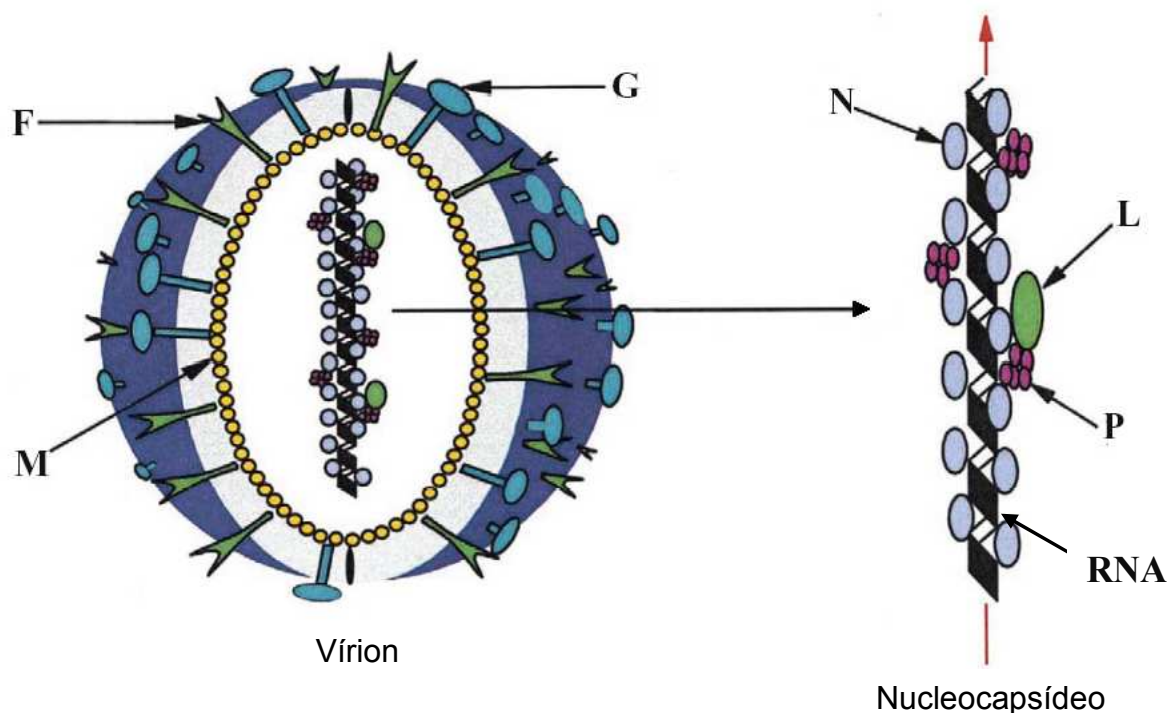


FIGURA 7 - a) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE UMA ÚNICA PARTÍCULA DE hMPV
 b) DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UMA PARTÍCULA DE PNEUMOVIRUS
 FONTE: Freymuth *et al.* (2009), Modificado de Easton *et al.* (2004)

2.2.3 Organização genômica

O genoma do hMPV apresenta oito unidades de transcrição distintas, dispostas linearmente, com cada unidade separada por uma pequena sequência não transcrita (EASTON *et al.*, 2004). Estas unidades são transcritas em mRNA distintos e subsequentemente traduzidos em nove proteínas, como segue: N (nucleoproteína, que envolve o RNA genômico), P (fosfoproteína), M (proteína não glicosilada da matriz viral), F (glicoproteína de fusão), M2-1 (fator de transcrição), M2-2 (fator de regulação e síntese de RNA), SH (pequena proteína hidrofóbica), G (glicoproteína de adesão), L (RNA polimerase dependente de síntese de RNA). As proteínas M2-1 e M2-2 apresentam ORFs que se sobrepõem a partir do mRNA do M2 (BIACCHESI *et al.*, 2003) (FIGURA 8).

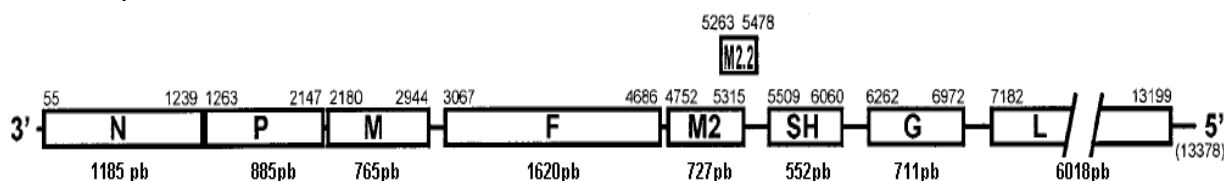


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO hMPV ISOLADO NL 00-1 (Genbank AF371337)

FONTE: Modificado de van den Hoogen *et al.* (2002) e Hamelin *et al.* (2004)

NOTA: As caixas representam os genes e os seus respectivos tamanhos em pares de base.

O primeiro gene no mapa genômico do hMPV (gene da nucleoproteína – N) apresenta 1.185-1.206 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 394 aminoácidos (~43,5 kDa), denominada N. O comprimento da ORF N é idêntico ao do APV sorotipo C e apresenta 88% de similaridade com o mesmo e apenas 7-11% de similaridade com outros paramixovírus. Esta região é extremamente conservada entre os vírus da família *Paramyxoviridae* (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A proteína N se associa com o RNA genômico do vírus e confere a estrutura helicoidal do nucleocapsídeo e liga-se a proteína P (EASTON *et al.*, 2004).

O segundo gene do mapa (gene da fosfoproteína – P) apresenta 885-909 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 294 aminoácidos (~32,5 kDa), denominada P. Estas seqüências aminoacídicas apresentam 68% de similaridade com o APV sorotipo C e apenas 22-24% com a proteína P do hRSV. Ling *et al.* (1995) sugerem que a região de alta similaridade entre os pneumovírus (região entre os aminoácidos 185-241) participa tanto na síntese do RNA (interagindo com a RNA polimerase) quanto na manutenção estrutural do nucleocapsídeo (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002).

O terceiro gene do genoma do hMPV (gene da matriz – M) apresenta 765-855 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 254 aminoácidos (~27,6 kDa), denominada M. O comprimento da ORF M é do mesmo tamanho que de outros metapneumovírus e com 76-87% de similaridade com o APV. No entanto, a similaridade entre outros pneumovírus é de 37-38% e entre outros paramixovírus de até 10% (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A proteína M faz a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral (EASTON *et al.*, 2004).

O gene F está localizado adjacente ao gene M, sendo esta uma característica do gênero *Metapneumovirus*. O gene F apresenta 1.620-1.645 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 539 aminoácidos (~58,4 kDa), denominada F. As seqüências aminoacídicas apresentam 81% de similaridade com o APV sorotipo C e 33-38% com outros pneumovírus. Uma das características da proteína F é a distribuição conservada dos resíduos de cisteína. Esta proteína é sintetizada como um precursor inativo F₀, sendo posteriormente clivada por proteases da célula hospedeira, gerando a subunidade F₂ N-terminal e F₁ C-terminal (hidrofóbica). A ruptura é requerida para a fusão viral (BASTIEN *et al.*, 2003), sendo que o sítio de clivagem do hMPV contém resíduos RQSR, os quais parecem estar relacionado com a patogenicidade viral (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002).

O gene M2 é apenas encontrado nos membros da subfamília *Pneumovirinae* e duas sobreposições das ORF foram vistas em todos os pneumovírus. O gene M2-1 codifica para uma proteína de 187 aminoácidos denominada M2-1 e apresenta 84% de similaridade com as seqüências aminoacídicas do APV sorotipo C. O gene M2-2, cuja ORF sobrepõem ao do gene M2-1, codifica para uma proteína de 71 aminoácidos denominada M2-2 que apresenta 26% de similaridade com o APV sorotipo C (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). Estas proteínas estão presentes na matriz do vírus (NJENGA *et al.*, 2003).

O gene SH se localiza ao lado do gene M2, apresenta 627 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 183 aminoácidos, denominada SH. Não foi possível encontrar similaridades entre estas seqüências aminoacídicas, com as de outros membros desta família (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A proteína SH, devido a sua hidrofobicidade apresenta grande afinidade com a membrana lipídica e a sua exata função ainda não foi esclarecida (EASTON *et al.*, 2004).

O gene G apresenta 711-732 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 236 aminoácidos, denominada G, que apresenta 53% de similaridade com o hRSV. Esta proteína é composta por uma extremidade N-terminal hidrofílica e uma região C-terminal hidrofóbica. Esta organização é condizente com características de uma proteína transmembrânica tipo 2, ancorada (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A glicoproteína G, é altamente glicosilada e faz parte do envelope viral, mediando a adesão do vírus ao receptor da

célula hospedeira (EASTON *et al.*, 2004). Embora estudos recentes mostrem que mesmo na ausência desta glicoproteína, o vírus se replica em células de cultivo celular, a eficiência desta replicação é significativamente diminuída em células humanas (BIACCHESSI *et al.*, 2005).

Em analogia com outros vírus de fita negativa, o último gene do genoma é um componente da replicação viral. O gene L apresenta 6.116-6.120 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 2.005 aminoácidos, denominada L. A proteína L apresenta 44% de similaridade aminoacídica com o hRSV (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A proteína L é uma RNA polimerase dependente de síntese de RNA, que é responsável pela síntese de todo RNA viral, incluindo o mRNA, intermediários de replicação e o RNA genômico da progênie. Esta proteína também é responsável pela metilação do mRNA e capeamento do mesmo (EASTON *et al.*, 2004).

Embora a função de cada produto gênico do hMPV não tenha sido formalmente testada, as similaridades com seqüências aminoacídicas de proteínas de outros paramixovírus serviram para prever a sua função (BROOR *et al.*, 2008).

As proteínas mais conservadas são: N, M, F, M2-1 e L (94% de identidade entre os subgrupos), seguidas por P e M2-2 (85-89%), SH (59%) e G (37%) (BIACCHESSI *et al.*, 2003; HAMELIN & BOIVIN, 2005). As proteínas F e G são os principais alvos para a resposta imune humoral por anticorpos neutralizantes (SKIADOPOULOS *et al.*, 2004; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004a), sendo que a proteína F é a mais antigênica e media a neutralização cruzada entre os genótipos A e B (SKIADOPOULOS *et al.*, 2004).

Baseado nas análises dos isolados CAN97-83 e CAN98-75, determinou-se que a transcrição é guiada por sinais em uma pequena região, no início e no fim de cada gene, indicando o início da transcrição e terminação/poliadenilação, respectivamente. A jusante de cada gene é delineada por um sinal de 12-15 nucleotídeos com o seguinte consenso: AGTTAnnnAAAAA. A montante de cada gene é delineada por um sinal de 16 nucleotídeos (GGGACAAnTnnnAATG). Uma característica é a presença de ATG na posição 14-16 de todos os isolados onde se inicia a principal ORF (BIACCHESSI *et al.*, 2003). Da mesma forma que em outros membros do gênero *Pneumovirus*, as seqüências intergênicas do hMPV variam em tamanho (BASTIEN *et al.*, 2003) (FIGURA 9).

		FINAL DO GENE	REGIÃO INTERGÊNICA	INÍCIO DO GENE		
		1 13		1 16		
le	(83)	aattta AGTTA caaa AAAAA cat		GGGACAA gTg AaAATG tctct	N	(83)
	(75)	aattta AaTT ccaa AcAAAA c-		GGGACAA aTaa AaAATG tctct		(75)
N	(83)	ttatg AGT a AttaAAAAA --	gt	GGGACAA gTc AaAATG tcatt	P	(83)
	(75)	ttatg AGT a AttaAAAAA --	ct	GGGACAA gTc AaAATG tcatt		(75)
P	(83)	tatgt AGT Ttaat AAAAA --	taaaaaat	GGGACAA gTg AaAATG gagtc	M	(83)
	(75)	catgt AGT Ttaat AAAAA --	taaacaat	GGGACAA gTc AaAATG gagtc		(75)
M	(83)	atttt AGTTA tat AAAAA --	tcaag- 24 nt-agaac	GGGACAA aTaa AaAATG tcttg	F	(83)
	(75)	attat AGTTA tat AAAAA	ttttag- 20 nt-aaagc	GGGACAA gTaa AaAATG tcttg		(75)
F	(83)	cagtt AGTTA att AAAAA --	taaaataaaattt	GGGACAA aTc AtAATG tctcg	M2	(83)
	(75)	tagtt AGTTA att AAAAA --	t	GGGACAA aTc AtcAATG tctcg		(75)
M2	(83)	actta AGTTA gta AAAA ---	cacatcagagt	GGGAtAA gTg AcAATG ataac	SH	(83)
	(75)	actta AGTTA gta AAAA ---	taaatagaat	GGGAtAA aTg AcAATG aaaaac		(75)
SH	(83)	agttt AGTTA tttt AAAA ---	tattt-114 nt-aatat	GGGACAA gTagtt ATG gaggt	G	(83)
	(75)	agtct AGTTA tttt AAAA ---	ctcta-107 nt-aaaat	GGGACAA gTggcc ATG gaagc		(75)
G	(83)	aaatt AGTTA aca AAAAA ---	tacga-180 nt-tccaa	GaGACAA aTagc AATG gatcc	L	(83)
	(75)	caagt AGTTA aca AAAAA ---	ctata-157 nt-ttcaa	GGGACAA aTaac AATG gatcc		(75)
L	(83)	atgat AGTTA att AAAAA ---	ttaaa-91 nt		tr	(83)
	(75)	ccatt AGTTA att AAAAA ---	ttata-63 nt			(75)
CONSENSO:		AGTTA nnnn AAAAA		GGGACAA nnnn AATG		

FIGURA 9 – REGIÕES CONSENSO NO INÍCIO E FINAL DE CADA GENE DOS ISOLADOS CAN97-83 E CAN98-75

FONTE: Modificado de Biacchesi *et al.* (2003)

2.2.4 Diversidade genética do hMPV

Estudos de seqüenciamento genômico e análise filogenética, identificaram que o hMPV apresenta 2 genótipos principais (A e B) e 5 subtipos (A1, A2a, A2b, B1 e B2) (FIGURA 10). Estas análises foram realizadas com seqüenciamento dos genes N, M, F, G ou L (BASTIEN *et al.*, 2003; BOIVIN *et al.*, 2004; HUCK *et al.*, 2006; MACKAY *et al.*, 2004; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004a). A identidade nucleotídica entre os genótipos A e B é de 81,5-85,3% e entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 é de 91,6-95,3% e 92-94,1%, respectivamente, baseando-se na análise do gene F (BOIVIN *et al.*, 2004; GALIANO *et al.*, 2006).

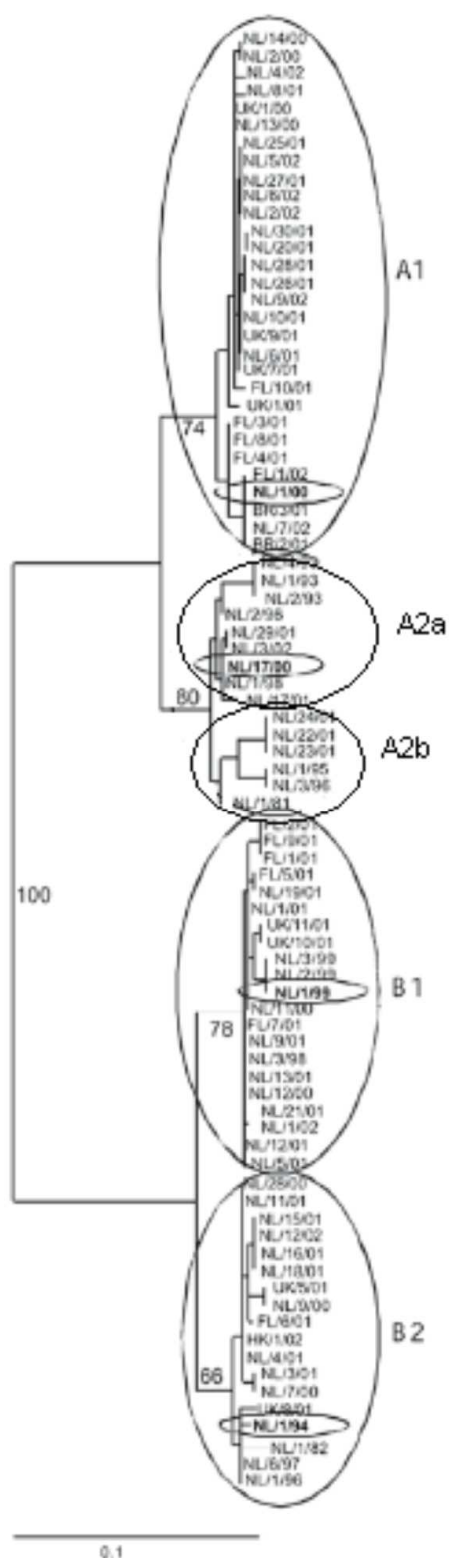


FIGURA 10: ÁRVORE FILOGENÉTICA DO hMPV CONSTRUÍDA COM BASE NA SEQÜÊNCIA PARCIAL DO GENE F (ORF POSIÇÕES 780 – 1221)

FONTE: Modificado de van den Hoogen *et al.*, (2004a)

NOTA: A árvore foi construída com análise de máxima semelhança usando 100 *bootstrap*. Os subtipos do hMPV estão destacados na árvore. Apenas os valores de *bootstrap* dos nodos principais são mostrados.

A organização genômica dos genótipos A e B do hMPV é idêntica (BIACHESI *et al.*, 2003). A maior diferença entre os dois genótipos é o polimorfismo nucleotídico, sendo que nas proteínas G e SH se concentram a maioria destes polimorfismos (BIACHESI *et al.*, 2003). Os altos níveis de similaridade nucleotídica e aminoacídica encontrados no gene F, confirmam o fato que esta proteína é conservada. No entanto, a similaridade nucleotídica (52,2-57,8%) e aminoacídica (29,9-32,9%) do gene G entre os genótipos A e B do hMPV é baixa, indicando que a proteína G é muito variável (TABELA 1) (GALIANO *et al.*, 2006).

TABELA 1: SIMILARIDADE NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA ENTRE AS CEPAS ARGENTINAS DE hMPV

Subtipos		A1		A2		B1		B2	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa	NT	aa
F ORF	A1	98,4-100	99,8-100	94,4-94,6	98,2-98,4	83,9-84,2	94,6	84,1-84,8	95,1-95,3
	A2			100	100	83,6	94,6	84,2-84,6	95,5
	B1					100	100	94,0-94,2	98,4
	B2							98,5	99,6
G ORF	A1	95,0-100	91,5-100	74,9-76,0	60,0-61,3	52,2-53,0	29,9-30,7	55,6-57,8	30,8-32,9
	A2			100	100	56,0	32,8	54,1-54,2	31,7-32,6
	B1					100	100	75,9-76,2	64,7-65,1
	B2							94,0	90,2

FONTE: Galiano *et al.*, 2006

NOTA: Os dados são demonstrados como % de similaridade nucleotídica (nt) e aminoacídica (aa).

Análises filogenéticas dos isolados de hMPV mostram que a epidemiologia deste vírus é complexa e dinâmica. Diferente do vírus influenza, onde duas ou três cepas circulam no mundo a cada ano, surtos de hMPV parece ser um fenômeno local. Cepas de hMPV identificadas em uma região podem ser muito similar às cepas encontradas em outras áreas geográficas em diferentes anos. Exemplificando: uma determinada cepa identificada na Holanda pode ser geneticamente similar às cepas identificadas na Austrália e no Canadá em diferentes anos (ESPER *et al.*, 2004). Baseado nas seqüências do gene F, os vírus isolados na Austrália (2001), França (2000 e 2002), Canadá (1999, 2000, 2001 e 2002), Israel (2002) e Holanda (2001) são muito similares, com poucos polimorfismos (BOIVIN *et al.*, 2004). Em um mesmo ano podem co-circular vírus de genótipos e subtipos diferentes (AGAPOV *et*

al., 2006; BOIVIN *et al.*, 2004; CARR *et al.*, 2005; ESPER *et al.*, 2004; KAIDA *et al.*, 2006; PERET *et al.*, 2002; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004a). Em Saint Louis, Missouri, o genótipo predominante do hMPV alternou entre A e B em anos consecutivos (AGAPOV *et al.*, 2006). Fenômenos similares também foram observados em outros estudos (GERNA *et al.*, 2005; LARCHER *et al.*, 2008).

As maiores diversidades genéticas entre os dois genótipos (A e B) ocorrem em genes estruturais (G > SH > F), sugerindo que os mesmos podem representar diversidade antigênica. Pesquisas realizadas em modelos animais (roedores e primatas não humanos) mostraram que a infecção com um genótipo protegeu da infecção pelo genótipo heterólogo. A proteção foi definida como inibição da replicação do hMPV no trato respiratório previamente infectado. Estudos com ensaios de neutralização cruzada com soros dos animais pós-infecção demonstraram que cada cepa induziu um alto título de anticorpos neutralizantes para cepas homólogas e heterólogas, sugerindo que os dois genótipos não representam sorotipos distintos (SKIADOPOULOS *et al.*, 2004). Contudo, van den Hoogen *et al.* (2004a), usando furões, demonstraram que o soro obtido de um animal infectado por um genótipo não conseguiu neutralizar um vírus de genótipo heterólogo *in vitro*, indicando que os dois genótipos apresentam, de fato, diversidade antigênica. A antigenicidade do hMPV em humanos ainda precisa ser determinada. Tais informações devem ser consideradas ao se estudar qual o tipo de vacina (monovalente ou bivalente) que poderá ser desenvolvida para prevenção da infecção pelo hMPV.

2.2.5 Replicação do hMPV

A adesão dos hMPV à célula hospedeira é mediada pela ligação da proteína G a receptores celulares, os quais ainda não foram determinados; todavia, supõe-se que estes receptores contêm ácido siálico (FELDMAN *et al.*, 2000; ISHIGURO *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2009; SPILKI *et al.*, 2008). Essa etapa é provavelmente completada por uma segunda ligação da proteína F, e talvez ainda da proteína SH, às proteínas de superfície da membrana celular (SCHLENDER *et al.*, 2003; SPILKI *et al.*, 2008). Conforme mencionado anteriormente, uma amostra de hMPV

recombinante, com deleção dos genes G e SH, pode multiplicar-se de forma eficiente *in vitro*, o que sugere que a proteína F pode mediar sozinha a ligação do vírus à célula hospedeira (BIACCHESSI *et al.*, 2005). Após a adesão, o hMPV adentra a célula por fusão do envelope viral à membrana celular, sendo este mecanismo mediado pela proteína F (EASTON *et al.*, 2004; GALINSKI, 1991; SPILKI *et al.*, 2008), que é clivada por enzimas celulares, como a tripsina, sendo que a clivagem é mais eficiente quando no sítio de ligação com a enzima existirem aminoácidos básicos. Após a clivagem, a subunidade hidrofóbica é translocada pela membrana da célula hospedeira permitindo a penetração do nucleocapsídeo do hMPV. A transcrição do genoma viral em mRNAs por ação do complexo RNA polimerase dependente de síntese de RNA inicia-se no citoplasma celular (EASTON *et al.*, 2004).

A RNA polimerase viral transcreve o genoma viral iniciando na extremidade 3' do mesmo, e os genes são transcritos de maneira seqüencial, terminando e reiniciando a cada uma das junções intergênicas (EASTON *et al.*, 2004; SPILKI *et al.*, 2008). Ocasionalmente, o complexo RNA polimerase dependente de síntese de RNA falha em reiniciar a transcrição em genes localizados mais próximos à extremidade 5' do genoma, o que resulta em um gradiente de acúmulo dos mRNAs mais próximos ao início do genoma (3') (EASTON *et al.*, 2004; GALINSKI, 1991; SPILKI *et al.*, 2008).

A síntese de antigenomas (5'→3' – fita positiva de RNA), que servirão de molde na síntese de novos genomas virais de polaridade negativa, inicia apenas após a tradução dos primeiros transcritos primários em proteínas virais. A síntese dos antigenomas é mediada pela mesma polimerase viral; todavia, na síntese destas cópias complementares ao do genoma do vírus, o complexo enzimático ignora todas as junções gênicas. Acredita-se que, de modo genérico para os paramixovírus, a concentração de proteína N no meio celular, determine a mudança do estado de transcrição para a replicação do RNA viral. (EASTON *et al.*, 2004; GALINSKI, 1991; SPILKI *et al.*, 2008).

Os antigenomas são de 10 a 20 vezes menos abundantes que o genoma viral em uma célula infectada; mas mesmo assim, podem ser encontrados vírions empacotando essas moléculas intermediárias na síntese de novos genomas virais, pois não há um sinal específico de encapsidação. A montagem dos nucleocapsídeos ocorre no citoplasma, e supõe-se que a mesma ocorra em passos distintos.

Primeiramente, a proteína N livre se associa aos genomas ou antigenomas, formando um complexo ribonucleoprotéico (RNP) de simetria helicoidal. Na segunda etapa, as proteínas P e L se associam à RNP, formando o nucleocapsídeo. A proteína M direciona os nucleocapsídeos às regiões da membrana celular, ricas em proteínas de superfície viral, e mais apropriadas ao brotamento da partícula viral. A maturação da partícula viral acontece na superfície da célula hospedeira, e os vírions permanecem firmemente aderidos à membrana celular até o brotamento viral (EASTON *et al.*, 2004; GALINSKI, 1991; SPILKI *et al.*, 2008).

2.2.6 Replicação do hMPV *in vitro*

Poucas linhagens celulares são susceptíveis a infecção pelo hMPV, dentre elas: LLC-MK2 (células de rim de macaco *Rhesus*); VERO (células de rim de macaco verde africano); HEp-2 (células de carcinoma de laringe); tMK (rim de macaco terciário). Todas as linhagens apresentam dependência de tripsina para a infectividade, a qual é necessária para a clivagem e ativação da proteína de fusão (F). O efeito citopático consiste em um arredondamento e granulação celular, seguido da ruptura de membrana e formação de focos multicelulares, devido à ação da proteína F, progredindo lentamente para o descolamento da monocamada de células (FIGURA 11) (CHAN *et al.*, 2003). O efeito citopático torna-se evidente após aproximadamente 17 dias (variação de 3-23 dias), principalmente nas linhagens celulares LLC-MK2, HEp-2 e tMK (BOIVIN *et al.*, 2002; CHAN *et al.*, 2003; HAMELIN *et al.*, 2004). O hMPV não adsorve eritrócitos e a detecção deste vírus por cultivo celular é baseada na reação de RT-PCR a partir do sobrenadante infectado (BIACCHESSI *et al.*, 2005; BOIVIN *et al.*, 2002; CASAS *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2003; HAMELIN *et al.*, 2004).

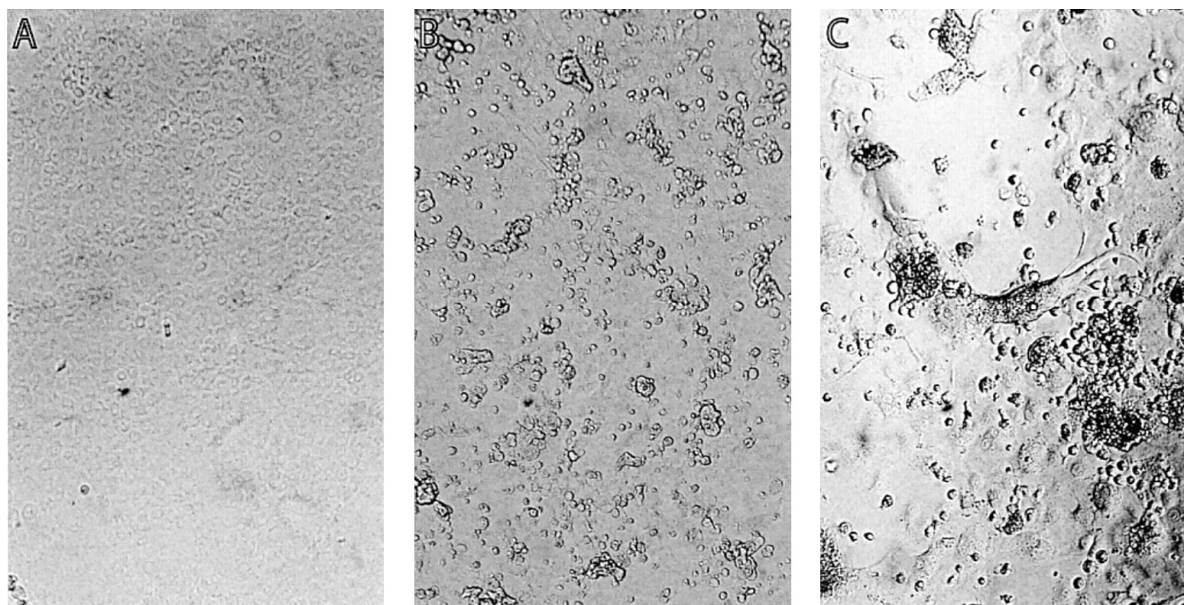


FIGURA 11 - EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO EM CÉLULAS LLC-MK2 INFECTADAS POR hMPV.

FONTE: Hamelin *et al.* (2004).

NOTA: A) Célula não infectada. B) Efeito citopático do hMPV consistindo em arredondamento das células. C) Efeito citopático consistindo na formação do sincício.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR hMPV

Após a primeira descrição do vírus em 2001, muitos países em todos os continentes descreveram a sua associação com doenças no trato respiratório em indivíduos de todas as faixas etárias (BASTIEN *et al.*, 2003; CUEVAS *et al.*, 2003; EBIHARA *et al.*, 2004; ESPER *et al.*, 2003; FREYMOUTH *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2006b; HOWE, 2002; MADHI *et al.*, 2003; MAGGI *et al.*, 2003; MIRAZO *et al.*, 2005; PEIRIS *et al.*, 2003; RAO *et al.*, 2004).

No Brasil, o primeiro estudo realizado para investigar a presença deste vírus em amostras clínicas foi realizado por Cuevas *et al.* em 2003. O estudo envolveu 111 amostras de ANF de crianças com idade inferior a 3 anos, que foram atendidas em clínicas e hospitais na Cidade de Aracajú (SE) com diagnóstico de IRA. Foi demonstrado que 48% (53/111) das crianças tinham infecção por hRSV, 17% (19/111) por hMPV e 7% (8/111) tinham co-infecções por hRSV/hMPV. Adicionalmente, evidenciou-se que esta infecção coincidiu com o período das

chuvas e que ocorre simultaneamente com a circulação do hRSV (CUEVAS *et al.*, 2003).

O primeiro relato de análise genética dos hMPV circulantes na América Latina foi publicado por Galiano *et al.* (2006) de amostras da Argentina e por Gray *et al.* (2006a), que descreveram a detecção dos genótipos B1 e B2 em amostras coletadas de pacientes do Peru e Argentina nos anos de 2002 a 2003. No Brasil, a primeira caracterização genética do hMPV foi publicada por Debur *et al.* (2007), em um estudo utilizando amostras de ANF obtidas de crianças hospitalizadas, onde, relatou-se uma positividade de 6,4% do hMPV nas amostras de ANF analisadas e a circulação do genótipo A1 no ano de 2000.

A incidência da infecção por hMPV no mundo varia de 1,5 a 41%, sendo que esta diferença está relacionada ao tipo de população estudada (KÖNIG *et al.*, 2004; MAHALINGAM *et al.*, 2006). Cuevas *et al.* (2003) observaram uma maior frequência de infecção por hMPV em pacientes atendidos ambulatorialmente, em comparação com pacientes hospitalizados. A maior gravidade da infecção é relatada em crianças, principalmente com menos de 2 anos de idade, idosos e indivíduos imunocomprometidos (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004b).

Em um estudo realizado em 2004 por Boivin *et al.*, com seqüências de hMPV isoladas em todos os continentes, verificou-se que 68,8% dos isolados pertenciam ao genótipo A (14,1% do subtipo A1 e 54,7% do subtipo A2), enquanto 31,2% eram do genótipo B (23,4% subtipo B1 e 7,8% subtipo B2). Algumas pesquisas mostraram que as amostras do genótipo A estavam mais envolvidas com infecções em crianças e em pacientes com doenças crônicas de base (cardiológico e/ou pulmonar) e as do genótipo B com infecções em adultos, principalmente imunossuprimidos (BOIVIN *et al.*, 2004; CHANO *et al.*, 2005). Vicente *et al.* (2006) sugeriu que o genótipo A é mais patogênico que o genótipo B, causando um quadro clínico mais grave em crianças. Entretanto, Agapov *et al.* (2006) não encontraram diferenças no quadro clínico em infecções por hMPV de diferentes genótipos.

Vários relatos indicam que o hMPV apresenta uma distribuição sazonal, similar ao do hRSV e FLU A, contudo infecções por hMPV são usualmente diagnosticadas no final do inverno e início da primavera (BOUSCAMBERT-DUCHAMP *et al.*, 2005; CHANO *et al.*, 2005; EBIHARA *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2006b; JARTTI *et al.*, 2002; MULLINS *et al.*, 2004; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004b). A distribuição sazonal similar a outros vírus respiratórios pode resultar em

co-infecção principalmente com hRSV, onde os sintomas, geralmente, são mais exacerbados (CUEVAS *et al.*, 2003; GREENSILL *et al.*, 2003; KONIG *et al.*, 2004).

2.3.1 Estudos soroepidemiológicos

Estudos soroepidemiológicos do hMPV mostraram que o vírus está circulando há pelo menos 50 anos (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001) e que 89,1% das crianças menores de 5 anos apresentam anticorpos (Ig G) específicos para este vírus. A prevalência é de 55% em crianças entre 6 a 11 meses, diminuindo para 36% em crianças de 12 a 23 meses (GRAY *et al.*, 2006b). Mais de 90% dos indivíduos com mais de 5 anos apresentam evidências de exposição prévia ao vírus (LEUNG *et al.*, 2005; MIRAZO *et al.*, 2005; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Supostamente há dois períodos de aquisição de infecção por hMPV em crianças. Um, nos primeiros 3 anos de vida, onde a percentagem de anticorpos específicos é de 35 a 45%. O segundo período é após os 4 anos onde a percentagem de anticorpos específicos aumenta para 77,3% alcançando 90-100% em crianças maiores de 5 anos. Este segundo pico pode estar relacionado com o aumento da exposição ao vírus em pré-escolas (LEUNG *et al.*, 2005; MIRAZO *et al.*, 2005; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Casos de infecções graves por hMPV em adultos (BOIVIN *et al.*, 2002) e re-infecções em indivíduos imunocomprometidos (PELLETIER *et al.*, 2002) sugerem que por mais que a infecção seja universal aos 5 anos de idade, novas infecções podem ocorrer, devido, provavelmente, a resposta imunológica incompleta e/ou infecção por outro subtipo. Doenças mais graves foram relatadas principalmente em pacientes pediátricos, o que sugere que a primeira infecção induz uma proteção parcial contra o agravamento da infecção (BROOR *et al.*, 2008; EBIHARA *et al.*, 2004). Entretanto, é importante enfatizar que não há evidências de proteção cruzada entre os subtipos em humanos. Três estudos relataram casos de crianças, com menos de 12 meses de idade, que em um período menor de um ano foram infectadas duas vezes pelo hMPV, sendo que cada infecção foi causada por um subtipo diferente do vírus (EBIHARA *et al.*, 2004; PELLETIER *et al.*, 2002; VARGAS *et al.*, 2004).

2.4 PATOGENIA DA INFECÇÃO POR hMPV

Em modelo animal de camundongo BALB/c, a infecção por hMPV resultou em doença clínica, com replicação viral e patologia pulmonar. Análises realizadas em lavados broncoalveolares (BAL) coletados em diferentes dias após a inoculação do vírus nestes camundongos mostraram que neutrófilos representavam 90% do total de células no dia 1 e diminuíram gradativamente após o terceiro dia. A percentagem de linfócitos aumentou a partir do terceiro dia, alcançando um pico de 48% do total de células no dia 6. O hMPV não alterou o número de eosinófilos. Em relação à resposta imunológica, a soroconversão foi detectada após 5 dias da inoculação, detectando-se tanto IgG1 e IgG2a, indicando que o hMPV pode induzir a resposta Th1/Th2. Entretanto, IgA e IgE vírus-específico não foram detectados no soro. Níveis aumentados de Interleucina-4 e interferon-gama (IFN- γ) foram detectados no tecido pulmonar durante o curso da infecção, ao contrário da Interleucina-5, a qual não foi detectada. Como sinal clínico, relatou-se a obstrução do trato respiratório que foi significativa durante os dois primeiros dias após a inoculação. Análises histológicas do pulmão mostraram anormalidades caracterizadas por um abundante infiltrado perivascular de linfócitos, sendo este, moderado na região peribronquiolar e bronquiolar. Verificou-se que a replicação pulmonar do vírus ocorreu entre os dias 3 e 5 após a inoculação (DARNIOT *et al.*, 2005).

Estudos sobre a patogênese da infecção pelo hMPV em humanos, são ainda escassos. Amostras de BAL após 4 dias de detecção de hMPV nas secreções nasais de crianças com infecção do trato respiratório, demonstraram que este vírus afeta primariamente células do epitélio do trato respiratório. A infecção nestas células resulta em degeneração e/ou necrose, perda dos cílios celulares e arredondamento, inclusões citoplasmáticas vermelhas, abundantes neutrófilos e produção de muco proeminente. Biópsias de pulmão, realizadas após 1 mês da detecção do hMPV no ANF, mostraram que estágios tardios da doença causada pelo vírus incluem a expansão do tecido linfóide peribronquiolar, metaplasia escamosa e acúmulo de macrófagos espumosos no espaço intra-alveolar. Estas características indicam cronificação/cura da inflamação com um grau de obstrução do trato respiratório e prejuízo da camada muco-ciliar, o que correlaciona bem com

um quadro de bronquiolite e respiração ruidosa comum em pacientes com infecção por hMPV (PRINCIPI *et al.*, 2006; VARGAS *et al.*, 2004).

Os estudos sobre a patogênese da infecção pelo hMPV são contraditórios, sendo desta forma, necessários maiores esforços para que se compreenda como o hMPV desencadeia a doença. Em crianças infectadas por hMPV foram encontradas altas concentrações de interleucina-8 (fator quimioestático para neutrófilos) e baixas concentrações de RANTES (fator quimioestático para eosinófilos) no aspirado de nasofaringe (JARTTI *et al.*, 2002). Em contraste, Lahan *et al.* (2004) encontraram as duas citocinas em concentrações diminuídas. Jartti *et al.* (2002) demonstraram que 29% dos casos tiveram linfopenia e em 6% as transaminases estavam elevadas. Dados disponíveis sugerem que o hMPV causa uma doença leve em crianças saudáveis e problemas severos em crianças com doenças de base (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004b), como nos casos de 2 pacientes com leucemia linfoblástica que evoluíram para óbito (BOIVIN *et al.*, 2002; PELLETIER *et al.*, 2002).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR hMPV

O hMPV pode ser transmitido por meio de contato direto com a secreção respiratória (MAHALINGAM *et al.*, 2006), sendo que as crianças infectadas geralmente excretam o vírus por mais de 10 dias (FALSEY *et al.*, 2006; JOFRÉ *et al.*, 2007; SARASINI *et al.*, 2006). Relatos de infecção hospitalar por hMPV permitiram determinar que o período de incubação do vírus é de 5 a 6 dias (JOFRÉ *et al.*, 2007; PEIRIS *et al.*, 2003), e que os sintomas de febre, tosse, coriza, dispnéia e respiração sibilosa freqüentemente duram $4 \pm 1,8$ dias (FALSEY *et al.*, 2006; VIAZOV *et al.*, 2003).

Williams *et al.* (2004) conduziram um estudo retrospectivo no período de 1976 a 2001 no Centro Médico Universitário de Vanderbilt (Estados Unidos), com mais de 2.000 amostras de ANF de crianças de 0 a 5 anos de idade com IRA e identificou o hMPV em 20% dos casos. Nesta pesquisa foi observado que as manifestações clínicas da infecção por hMPV em crianças são similares a infecção pelo vírus hRSV. Os sintomas clínicos mais freqüentemente relatados foram taquipnéia, febre, tosse, hipóxia, otite, apnéia, conjuntivite e alterações no raio X de

tórax, como infiltrados, hiperinsuflação e espessamento da parede bronquial, como também descritos em outros estudos (JOFRE *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2004). Nenhuma manifestação específica do hMPV foi relatada até o momento. Infecções assintomáticas em crianças são praticamente incomuns (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Crianças, principalmente menores de 2 anos de idade (MAGGI *et al.*, 2003), com infecções pelo hMPV no trato respiratório inferior, comumente requerem hospitalizações por um período médio de 7 dias (BACH *et al.*, 2004; SAMRANSAMRUAJKIT *et al.*, 2006), sendo que os diagnósticos clínicos mais freqüentes são bronquiolite, bronquite e pneumonia (KHAN *et al.*, 2006). Comparando com as infecções por hRSV, observa-se que a faixa etária das crianças infectadas pelo hMPV é geralmente mais alta e a gravidade da infecção é um pouco menor. Os fatores de risco associados a casos graves de infecções por hMPV são prematuridade, doença pulmonar ou cardíaca e comprometimento do sistema imune (KHAN *et al.*, 2006; VICENTE *et al.*, 2006).

O hMPV também foi relatado como agente etiológico de infecções respiratórias em adultos e idosos (BOIVIN *et al.*, 2002; FALSEY *et al.*, 2003). Em adultos, esta infecção está associada com resfriado, síndromes gripais, bronquite, pneumonia, exacerbações de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (BOIVIN *et al.*, 2002; FALSEY *et al.*, 2003). Falsey *et al.* (2003) detectaram o hMPV em 3,6% casos de IRA em adultos. Os fatores de risco mais descritos para infecções no trato respiratório inferior por hMPV em pacientes adultos seriam a idade avançada e doença cardiopulmonar (KHAN *et al.*, 2006). Em idosos com doença de base, a infecção por hMPV podem levar a quadros de pneumonia, sendo esta algumas vezes fatais (BOIVIN *et al.*, 2002; FALSEY *et al.*, 2003). A dispnéia é mais relatada em pacientes idosos do que em adultos jovens infectados pelo hMPV (FALSEY *et al.*, 2003).

O estado imune dos pacientes infectados é um fator importante para determinar a gravidade da infecção. O hMPV tem sido descrito em indivíduos imunossuprimidos (CANE *et al.*, 2003; DARE *et al.*, 2007; ENGLUND *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2009; MADHI *et al.*, 2003; MADHI *et al.*, 2007; MARTINO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008). O vírus pode causar infecção prolongada e grave nestes indivíduos, principalmente nos pacientes com doenças hematológicas, pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas e transplante pulmonar (LARCHER *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Williams *et al.* (2005a) realizaram um estudo envolvendo 251 pacientes com doenças hematológica malignas que apresentavam quadros de IRA. O hMPV foi detectado em 22 (9%) casos de IRA. Destes, 20 tiveram sintomas no trato respiratório superior, oito evoluíram com infecção no trato respiratório inferior, sendo que 3 pacientes morreram e dois deles com co-infecção bacteriana (WILLIAMS *et al.*, 2005a). Pelletier *et al.* (2002) descreveram três casos de infecções no trato respiratório inferior de pacientes com leucemia linfocítica aguda, sendo que o hMPV foi o único patógeno detectado e um destes casos foi fatal. Madhi *et al.* (2003) relataram casos de infecções por hMPV em crianças infectadas pelo HIV, mas outros estudos precisam ser feitos para esclarecer a gravidade desta infecção neste grupo de pacientes.

De um modo geral, infecções respiratórias por vírus estão freqüentemente associadas com dificuldade respiratória em crianças e exacerbação da asma em pacientes adultos (BROOR *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2005b). Tanto a respiração ruidosa, quanto os casos de exacerbação de asma foram descritos em infecções pelo hMPV (JARTTI *et al.*, 2002; PEIRIS *et al.*, 2003), entretanto, estudos realizados por Rawlinson *et al.* (2003) não mostraram esta associação (RAWLINSON *et al.*, 2003). Em algumas pesquisas envolvendo crianças com asma, o hMPV foi mais freqüentemente encontrado do que o hRSV (PEIRIS *et al.*, 2003; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2003)

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO hMPV

Estudos prévios envolvendo o diagnóstico laboratorial do hMPV, utilizaram as seguintes metodologias: técnicas de isolamento viral por cultivo celular (REINA *et al.*, 2007), detecção do antígeno por imunofluorescência direta (FENWICK *et al.*, 2007), imunofluorescência indireta (EBIHARA *et al.*, 2005) e por ensaio imunoenzimático (KUKAVICA-IBRULJ & BOIVIN, 2009), métodos moleculares (CÔTÉ *et al.*, 2003; DARE *et al.*, 2007; THOMAZELLI, *et al.*, 2007) e ensaios sorológicos (LEUNG *et al.* 2005; LIU *et al.*, 2007; HAMELIN & BOIVIN *et al.*, 2005).

O isolamento por cultivo celular em linhagens de rim de macaco (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 ou células HEP-2 é a técnica clássica de detecção viral, no

entanto, requer muito tempo para a emissão do resultado, pois o efeito citopático torna-se evidente após aproximadamente 17 dias da inoculação (BOIVIN *et al.*, 2002). Alternativamente, pode-se utilizar a cultura rápida em *Shell vial*, que promove a entrada do vírus na célula e o tempo necessário para isolamento do mesmo varia de 2 a 5 dias. Em ambos os casos, para a confirmação do isolamento é preciso realizar a detecção do vírus por um segundo método (detecção do antígeno ou método molecular) (PERCIVALLE *et al.*, 2005; REINA *et al.*, 2007).

Ensaio de imunofluorescência usando anticorpos específicos geralmente é um método rápido para detectar vírus respiratórios, sendo comumente usados em laboratórios clínicos (EBIHARA *et al.*, 2005). Estão disponíveis comercialmente anticorpos específicos para o hMPV para serem usados em ensaios de imunofluorescência direta e indireta (anticorpos monoclonais da DAKO, Ely, Cambridgeshire, UK e CHEMICON International, Inc., respectivamente). No entanto, esta metodologia não apresentou uma boa sensibilidade analítica (EBIHARA *et al.*, 2005; LANDRY *et al.*, 2005; PERCIVALLE *et al.*, 2005), além de requerer habilidade do analista e coleta adequada do material (EBIHARA *et al.*, 2005; FOX, 2007; LEUNG *et al.*, 2005; MADELEY & PEIRIS, 2002). O padrão de imunofluorescência freqüentemente relatado para o hMPV é granular e citoplasmático (FIGURA 12) (EBIHARA *et al.*, 2005, FREYMUTH *et al.*, 2009).

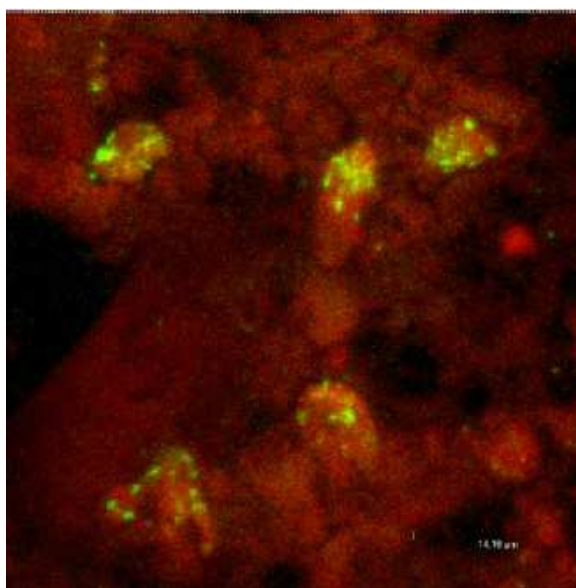


FIGURA 12 - PADRÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA NASOFARINGE INFECTADAS POR hMPV MARCADAS COM O ANTICORPO MONOCLONAL (Dako, Ely, Cambridgeshire, UK)
FONTE: Fenwick *et al.* (2007)

Kukavica-Ibrulj & Boivin (2009) relataram a validação do kit da *Biotrin® International* Ltd. (Dublin, Ireland), que é um teste imunoenzimático qualitativo de captura de antígeno para detecção do hMPV. Anticorpos monoclonais contra as proteínas da matriz e proteína de fusão são adsorvidos nos poços da placa e as amostras de secreção respiratória são testadas neste ensaio. Este kit foi capaz de detectar ambos os genótipos do hMPV, porém com uma sensibilidade menor do que o RT-PCR, mas com a vantagem de ser mais rápido e barato. A única limitação do teste é a impossibilidade de utilização de amostras previamente congeladas e descongeladas, pois pode ocasionar a degradação do antígeno e influenciar no resultado (KUKAVICA-IBRULJ & BOIVIN, 2009).

Recentemente, métodos de EIE (Ensaio imunoenzimático) usando proteínas N ou F expressas em procariontes (HAMELIN & BOIVIN, 2005) ou vírus da estomatite vesicular (VEV) (LEUNG *et al.*, 2005) e baculovírus recombinante (LIU *et al.*, 2007) foram desenvolvidos para detecção de anticorpos contra o hMPV. Estudos sorológicos são importantes para análises retrospectivas entre infecções primárias e re-infecções pelo hMPV, permitindo um melhor entendimento da resposta imune e da epidemiologia deste vírus. No entanto, estes testes não são úteis para um diagnóstico rápido da infecção aguda pelo hMPV, pois é preciso demonstrar a soroconversão (BROOR *et al.*, 2008).

Deste modo, metodologias moleculares, como o ensaio de RT-PCR realizada de forma convencional ou a RT-PCR em Tempo Real são as técnicas que têm apresentado os melhores resultados para a detecção do hMPV (LOVATO *et al.*, 2007), por oferecerem sensibilidade, especificidade e rapidez (EBIHARA *et al.*, 2005; LANDRY *et al.*, 2005; MACKAY *et al.*, 2003; MAERTZDORF *et al.*, 2004). Iniciadores direcionados para amplificação dos genes L, N, F ou P tornaram-se testes “padrão-ouro” para o diagnóstico da infecção pelo hMPV, pois são genes conservados em todos os subtipos (CÔTÉ *et al.*, 2003; MACKAY *et al.*, 2004).

Alternativamente ao RT-PCR convencional e RT-PCR em Tempo Real, outras metodologias moleculares foram descritas para a detecção do hMPV. Pesquisadores da Universidade de São Paulo utilizaram a técnica de RT-PCR convencional para o gene F, com o iniciador *forward* marcado com o fluoróforo FAM. O *amplicon* foi submetido a uma eletroforese em um seqüenciador automático de DNA, no qual o produto fluorescente foi detectado e quantificado pelo *software*

GeneScan® (OLIVEIRA *et al.*, 2009; THOMAZELLI, *et al.*, 2007). A vantagem desta técnica é a alta sensibilidade na detecção dos vírus pesquisados, porém o custo desta metodologia se torna muito elevado. Dare *et al.* (2007) utilizaram a metodologia de amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA), tendo o gene M como alvo para detecção do hMPV em amostras do trato respiratório. A sensibilidade e especificidade desta técnica foram menores que a do RT-PCR em tempo real para o gene N (DARE *et al.*, 2007).

Objetivando diminuir o custo da subtipagem do hMPV, Montes *et al.* (2007) descreveram a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, associado com a análise do Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP). O método realiza a amplificação de uma região do gene F, seguido da digestão do produto amplificado com a enzima *Tsp509I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e análise dos fragmentos em um gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio, conforme demonstrado na Figura 13.

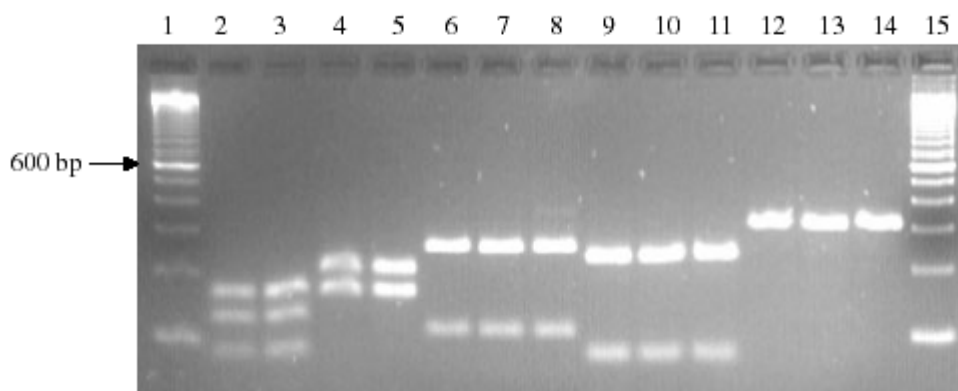


FIGURA 13 – SUBTIPAGEM DO hMPV UTILIZANDO O MÉTODO DE PCR-RFLP PARA O GENE F.
FONTE: Montes *et al.* (2007)

NOTA: Linhas 1 e 15: Peso molecular 100 pb (TrackIt; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Linhas 2 e 3: hMPV subtipo B1, Linhas 4 e 5: hMPV subtipo B2, Linhas 6-8: hMPV subtipo A1, Linhas 9-11: hMPV subtipo A1a, Linhas 12-14: hMPV subtipo A2b.

2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR hMPV

Até o momento, nenhuma vacina ou quimioterapia específica estão disponíveis para prevenção ou tratamento da infecção por hMPV.

Wyde *et al.* (2004) reportaram resultados de um estudo pré-clínico sugerindo que a ribavirina e imunoglobulina G intravenosa, administradas sozinhas ou em combinação, podem apresentar algum valor clínico. Estudos em cultura celular identificaram que a heparina e o *sulfated sialyl lipid* (NMSO₃) foram capazes de inibir a replicação do hMPV e, portanto, serviriam como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, por analogia de estrutura química (WYDE *et al.*, 2004).

Estudos para o desenvolvimento de uma vacina específica estão em progresso com modelos animais. Tang *et al.* (2005) estudaram a expressão de uma proteína quimérica contendo proteínas do vírus parainfluenza humano tipo 3 e a proteína F do hMPV na imunização de macacos verdes africanos contra o hMPV, testando uma possível vacina. A proteína F, além de ser conservada entre os diferentes grupos de hMPV, foi suficientemente imunogênica para permitir a proteção contra a infecção por hMPV na ausência de outras glicoproteínas de superfície, como a G e a SH. A exposição à proteína F do hMPV do grupo A protegeu contra a infecção pelo hMPV do grupo B, porém este protótipo de vacina ainda precisa passar por estudos clínicos (TANG *et al.*, 2005).

Biacchesi *et al.* (2005) e Phan *et al.* (2005) propuseram vacinas de vírus vivo atenuado recombinante. O primeiro grupo de pesquisadores desenvolveu um vírus hMPV recombinante atenuado com a deleção dos genes G e M2-2 em macacos verdes africanos. Após a vacinação em *hamsters*, o vírus não foi detectado no trato respiratório inferior (BIACCHESSI *et al.*, 2005). Phan *et al.* (2005) desenvolveram um vírus recombinante quimérico hMPV/APV, onde os genes N e P do hMPV foram trocados pelos respectivos genes do APV e atenuados em macacos verdes africanos. Esta apresentação foi tão imunogênica quanto o hMPV selvagem (PHAN *et al.*, 2005).

Avanços nos estudos de produção de vacinas e medicamentos são importantes para o controle deste novo patógeno e fundamentalmente, é a resposta da ciência para prevenir e evitar grandes epidemias.

3 JUSTIFICATIVA

A emergência de vírus respiratórios é um assunto atual, de grande interesse para os profissionais da área de saúde e a população em geral, sendo também de fundamental importância para os órgãos relacionados às políticas de saúde pública. Diversos trabalhos clínico-epidemiológicos demonstram o impacto destas infecções na saúde pública, como também na qualidade de vida dos indivíduos, além das acentuadas perdas econômicas. Pesquisas científicas envolvendo análises de grande número de pacientes sintomáticos respiratórios têm levado a descrição de novos agentes patogênicos virais no trato respiratório, dentre estes o hMPV. Até o presente momento, o conhecimento sobre a epidemiologia e a gravidade das infecções pelo hMPV na região sul do Brasil é limitado.

Embora uma terapia antiviral específica para hMPV não esteja disponível, a identificação dos pacientes infectados é importante para realizar o manejo clínico correto do paciente, prever o prognóstico da infecção e prevenir a transmissão nosocomial. Relatos científicos têm demonstrado que este agente é responsável por um importante número de hospitalizações por infecções respiratórias em pacientes pediátricos, idosos e imunossuprimidos. A padronização de um método para diagnóstico laboratorial deste vírus, bem como a sua pesquisa de rotina, contribuirá para diminuir o número de casos de IRA de etiologia indefinida, assim como, conhecer a importância deste agente na comunidade estudada (subtipos circulantes, sazonalidade, faixa etárias mais acometidas, formas de evolução clínica, mortalidade e associação com doença pulmonar progressiva crônica), além de contribuir com dados para os serviços de vigilância epidemiológica da instituição na tomada de medidas preventivas com o intuito de limitar a sua disseminação.

A caracterização genotípica das variantes circulantes possibilitará uma maior compreensão da circulação deste patógeno nesta comunidade, assim como permitirá a produção de insumos para o seu diagnóstico, além de prever qual o impacto que a imunização teria nesta população, quando houver a disponibilização das vacinas, que se encontram em fases iniciais de estudos clínicos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo realizar a identificação laboratorial do metapneumovirus humano (hMPV) em amostras de pacientes com infecção respiratória aguda hospitalizados no HC-UFPR e pacientes ambulatoriais participantes do Programa de Vigilância Epidemiológica do Influenza, durante os anos de 2006 a 2008.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de RT-PCR para detectar o gene N do hMPV em secreções respiratórias (aspirado de nasofaringe) e produzir um controle positivo por meio da tecnologia de DNA recombinante;
- Isolar o vírus em cultivo celular para ampliar a carga viral para posterior seqüenciamento do genoma do vírus;
- Determinar os subtipos de hMPV detectados por meio do seqüenciamento genético dos genes F ou N e por meio da metodologia de PCR seguido de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP);
- Determinar a sazonalidade e incidência de IRA por hMPV nos pacientes hospitalizados no HC-UFPR e atendidos nas unidades básicas de saúde de Curitiba;
- Descrever as características clínicas-epidemiológicas dos pacientes hospitalizados e ambulatoriais infectados pelo hMPV e correlacionar com os subtipos circulantes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo caracterizou-se como descritivo e de corte transversal. Essa pesquisa foi de caráter retrospectivo, pois analisou amostras armazenadas de ANF de pacientes com IRA hospitalizados no HC-UFPR e atendidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Bairro Alto e Salgado Filho, que foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR para pesquisa de vírus respiratórios, durante os anos de 2006 a 2008, portanto tratou-se de uma amostragem de conveniência. Quanto aos fins, foi uma pesquisa aplicada, pois objetivou a padronização do método de RT-PCR para diagnóstico laboratorial do hMPV, bem como a investigação das características clínico-epidemiológicas desse vírus. Assim sendo, essa pesquisa pode ser classificada em relação aos dados como quantitativa, em relação aos objetivos como descritiva e em relação aos procedimentos utilizados como experimental.

5.2 AMOSTRAS

O setor de virologia do HC-UFPR analisa anualmente em torno de 500 amostras clínicas para a pesquisa de vírus respiratórios. Este material é coletado de pacientes hospitalizados nas unidades de pediatria (Serviço de Emergência, Unidade de Terapia Intensiva e Infectologia) e na unidade de Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e de pacientes ambulatoriais atendidos nas UBS do Bairro Alto e do Salgado Filho, selecionados pelo Programa de Vigilância Epidemiológica do vírus Influenza do Ministério da Saúde. Alíquotas de todo o material analisado são armazenadas em meio de transporte viral (Tampão Fosfato Triptose com gelatina 0,5%, pH 7,2) em temperatura de -70°C para posterior análise por técnicas de biologia molecular e cultivo celular.

O HC-UFPR se caracteriza como um hospital terciário, ou seja, atendendo apenas casos de maior gravidade. Os pacientes são provenientes do pronto atendimento do HC-UFPR, pacientes transferidos de outros hospitais ou encaminhados de Unidades de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba e também da região metropolitana.

5.2.1 Critérios de inclusão

Amostras de ANF coletadas de pacientes com IRA hospitalizados no HC-UFPR e atendidos nas UBS do Bairro Alto e do Salgado Filho que foram encaminhadas ao laboratório de virologia do HC-UFPR durante os anos de 2006 a 2008.

5.2.2 Critérios de exclusão

Amostras transportadas fora do gelo ou coletadas em frascos inadequados, ou seja, frascos reutilizados.

5.3 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

A utilização de amostras humanas de secreção respiratória foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HC-UFPR sob número de registro 1198.046/2006-04 (ANEXO).

5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A coleta das amostras de ANF dos pacientes hospitalizados nas unidades de pediatria do HC-UFPR foi realizada no momento da internação para o tratamento da IRA e dos pacientes atendidos nas unidades de TCTH a coleta de ANF foi realizada de todos os pacientes que apresentavam algum sintoma de infecção respiratória. Os pacientes atendidos nas UBS do Bairro Alto e Salgado Filho que apresentavam sintomas de febre acompanhado de pelo menos uma manifestação clínica respiratória (tosse, dispnéia, respiração ruidosa, dor de garganta) e uma sistêmica (otalgia, mialgia, dor de cabeça) com início a não mais de 5 dias da data da coleta, eram convidados a participar do Programa de Vigilância Epidemiológica do vírus Influenza do Ministério da Saúde, sendo coletado, então, o ANF.

5.4.1 Processamento das amostras

O ANF transportado em meio de transporte viral (Tampão Fosfato Triptose com gelatina 0,5%, pH 7,2) foi centrifugado durante 10 minutos a 1.500 RPM. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas, uma para os testes de biologia molecular (RT-PCR) e outra para o isolamento viral em cultura de células, a qual foi tratada com antibiótico (penicilina e estreptomicina 1%) e antifúngico (anfotericina B 1mg/mL). Ambas as alíquotas foram armazenadas em freezer -70°C até a sua utilização. Por outro lado, as células no sedimento foram lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e depositadas sobre lâminas de vidro, fixadas em acetona à 4°C por 10 minutos e analisadas por meio do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) para os vírus FLUA, FLUB, hRSV, AdV, PIV 1, PIV2 e PV3 com o *kit* *CHEMICON International Inc* (Temecula, CA).

5.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA ASSOCIADA À REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DO GENE N.

5.5.1 Extração do RNA Viral

O RNA total foi extraído de 300 µL de amostra pelo método do tiocianato de guanidina conforme descrito por Casas *et al.* (1995).

Em um tubo *ependorf* foi acrescentado 300 µL de amostra clínica que foi aliquotada para a reação de RT-PCR e adicionou-se 200 µL do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 4 M, Citrato de sódio 25 mM pH 7,0, DTT 1 mM, *Sarkosyl* 0,5%, Glicogênio 1 µg/µL e 500 cópias de *Pseudorabies vírus* - PRV). A lise ocorreu em 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 250 µL de isopropanol frio, conservado à -20°C para precipitação do material genético. Após centrifugação a 13.000 - 14.000 g durante 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 500 µL de etanol 70% frio, conservado à -20°C para lavagem do *pellet*. Após nova centrifugação a 13.000 – 14.000 g durante 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo o RNA / DNA extraído foi ressuspenso em 22,5 µL de água livre de nuclease. O material genético foi conservado à -70°C até realização da transcrição reversa.

5.5.2 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase

A transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Mirazo *et al.* (2005), com algumas modificações. Após a extração, 7 µL do RNA foram utilizados para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando-se 62,5 µg de iniciador randômico (Amersham Pharmacia Biotech), incubando-se a 94°C por 2 minutos. Após resfriamento a 4°C foram adicionados 200 U da enzima transcriptase reversa (*Superscript II RT*, Invitrogen Life Technologies), 10 U do inibidor de RNase (Enzima *RNAse OUTTM*, Invitrogen Life Technologies), em solução tampão específica. A reação foi incubada

por 1h à 42°C de acordo com o protocolo da enzima transcriptase reversa (*Superscript II* RT, Invitrogen, Life Technologies).

O cDNA obtido foi amplificado para detectar uma região conservada do gene da nucleoproteína (N) (posições 112–1040 nucleotídeos, baseado na sequência AY297749) de 928 pares de base (pb). Para tanto, 2,5 µL do cDNA foram amplificados utilizando-se 5 pmol de cada um dos iniciadores N2 (5' – GAGTCTCAGTACACAATAA - 3') e N3 (5' – GCATTTCCGAGAACAACAC - 3'), 10 pmol de cada um dos iniciadores PRV1- (5' - ATGACGCCGATGTACTTCTTCTT - 3') e PRV1+ (5' – CGCGTGGTCTACGGGGACACGGA - 3'), 1,25 U da *Taq DNA polimerase* (Invitrogen, Life Technologies), 2,5 mM de solução de deoxinucleotídeos (dNTPs) e 50 mM de MgCl₂ (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA). A amplificação ocorreu com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos (APÊNDICE 1).

5.5.3 Detecção do Produto Amplificado

O produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% (Sigma Chemical) em tampão de corrida: 1.000 ml de TBE 1X (Tri-borato 0,09M e EDTA 0,002M) (Gibco BRL) pH 8,0 + 0,1 µl/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Foi utilizado na corrida eletroforética, juntamente com as amostras, controle positivo e negativo da reação, um marcador de massa molecular (*1Kb Plus DNA Ladder* - Invitrogen, Life Technologies). A corrida desenvolveu-se a 100 V/cm, por aproximadamente 45 minutos.

5.5.4 Validação de cada lote de extração e reação de RT-PCR para o gene N

Cada rotina de extração/RT-PCR/deteção das amostras de ANF foi analisada juntamente com um controle interno (plasmídeo contendo um inserto do PRV presente no tampão de extração), um controle negativo (água) e um controle positivo.

Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram banda de 928 pb no gel, mas apenas bandas de 190 pb, referente ao controle interno PRV.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda de 928 pb estando ou não presente a banda de 190 pb referente ao controle interno PRV.

As amostras que não apresentaram bandas de 190 pb e 928 pb, foram extraídas novamente.

5.6 PRODUÇÃO DE UM CONTROLE POSITIVO

Para a produção de um controle positivo, um produto de PCR de uma amostra positiva (nº 1853/00) para hMPV em aspirado de nasofaringe, foi purificado utilizando o *High Pure PCR Product Purification kit* (Roche Inc., Valencia, CA), e ligado em um vetor *pGEM-T (Easy Vector Systems, PROMEGA Inc., USA)* (FIGURA 14), com 3 U *Weiss* da enzima T4 DNA ligase, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A ligação obtida foi transformada em células de *E. coli (Top10F)* quimicamente competentes, conforme descrito por Raboni *et al.* (2007).

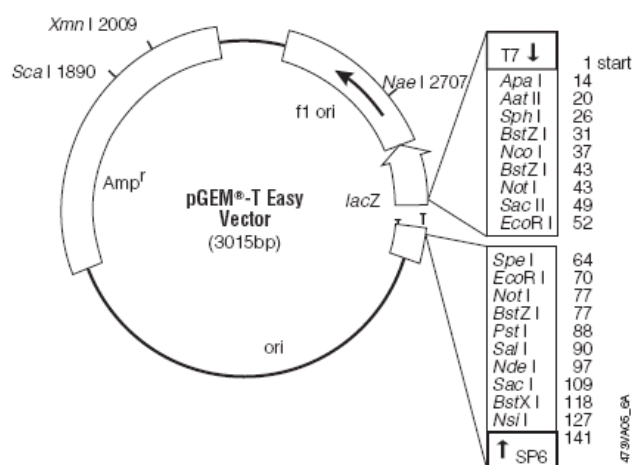


FIGURA 14 – MAPA CIRCULAR DO VETOR *pGEM-T* (PROMEGA).

FONTE: Manual técnico do *kit pGEM® - T* and *pGEM® - T (Easy Vector Systems)*, PROMEGA Inc, USA).

A análise dos clones recombinantes foi realizada pela técnica de PCR de colônia. As colônias brancas (marcador de seleção) foram transferidas para um tubo tipo *ependorf* com o auxílio de um palito, lisadas por aquecimento e utilizadas como alvo para amplificação do fragmento de 928pb do gene da nucleoproteína do hMPV. A amplificação foi realizada com 5 pmol de cada um dos iniciadores N2/N3, 2,5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl₂ (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 2,5 U de *Taq DNA polimerase* (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA). A ciclagem utilizada foi de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, separados com uma voltagem de 100 V por aproximadamente 45 minutos. A visualização do produto de 928 pb foi realizada sob luz ultravioleta, com auxílio do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies) aplicado juntamente no gel.

Após a interpretação dos resultados, escolheram-se três clones positivos para amplificação (pré-inóculo) em meio *Luria Broth* (LB) com ampicilina (100 µg/µL) a 37°C, durante a noite e sob agitação. Alíquotas de 500 µL de cada pré-inóculo foram separadas para confecção de estoque em glicerol 50% (v/v), armazenadas a

-20°C e a -70°C. Além disso, outra alíquota do pré-inóculo foi utilizada para extração do DNA plasmidial com o *QIAprep® Spin Miniprep kit* (QIAGEN Inc., CA), conforme descrito pelo fabricante.

Para verificar a presença do inserto no plasmídeo, 2 µL da mini-preparação dos três clones escolhidos, foi digerida com 10 U da enzima *Eco R1* (GIBCO BRL), por 1 hora à 37°C. O resultado da digestão foi analisado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A amostra foi separada sob uma voltagem constante de 100 V por aproximadamente 45 minutos, e o produto esperado de 928 pb visualizado sob luz ultravioleta com o auxílio de um marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies).

Para confirmar a identidade do clone, realizou-se o seqüenciamento do DNA inserido no plasmídeo com 5 pmol do iniciador pUC/M13 (*foward* e *reverse*), utilizando o *kit Big Dye Terminator Sequencing* em um analisador genético ABI 3100 (Applied Biosystems Inc., CA). A seqüência nucleotídica obtida (325 pb) foi primeiramente alinhada com seqüências previamente publicadas de hMPV, utilizando a ferramenta BLAST (*nucleotide-nucleotide BLAST – blastn*) disponível no *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov/>).

Com o intuito de caracterizar molecularmente a amostra selecionada para confecção do controle positivo selecionou-se seqüências completas do gene da nucleoproteína disponíveis no banco de dados do *GenBank* com os seguintes números de acesso: AY530089, AY530090, AY530091, AY530092, AY530093, AY530094 e AY530095, representando isolados de hMPV do Japão, entre os anos de 2003-2004; AY297748 do isolado CAN98-75 e AY297749 do isolado CAN97-83, ambos do Canadá; AF371337, AY525843, AY355328, AY355335 da Holanda, e como grupo controle um isolado de metapneumovírus aviário do tipo C (APVC) AF176590. As seqüências foram alinhadas com o *software ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) e analisada pelo método *bootstrapped neighbor-joining* (1.000 réplicas), usando a *complete deletion* e os parâmetros de Kimura-2 do *software* MEGA v.3 (KUMAR *et al.*, 2004).

O plasmídeo assim obtido foi utilizado como controle positivo das reações de PCR para confirmação da identificação do hMPV.

5.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE RT-PCR PARA O GENE N DO hMPV

Para determinar a sensibilidade de detecção do PCR, o plasmídeo recombinante foi diluído seriadamente (10^{-2} a 10^{-10}) a partir de uma concentração determinada por espectrofotometria. Em seguida, foi realizada a reação de PCR para amplificação do gene N do hMPV e o número de cópias detectadas foi calculado.

A especificidade do ensaio foi determinada testando amostras de ANF positivas por imunofluorescência indireta (Chemicon International Inc., Temecula, CA) para cada um dos vírus FLUA (nº 2228/06 e 1461/07), FLUB (nº 1956/06 e 724/07), hRSV (nº 1335/06, 1482/07 e 377/08), AdV (nº 1400/07 e 3316/08), PIV 1 (nº 450/06 e 2129/07), PIV2 (nº 1991/07 e 3356/08) e PIV3 (nº 1203/06 e 2639/07).

De forma a determinar uma possível inibição na amplificação do gene N pelo controle interno presente no tampão de extração, 500 cópias do PRV foram adicionadas a cada uma das diluições seriadas do plasmídeo recombinante (10^{-2} a 10^{-10}) e a reação de PCR para o gene N foi realizada conforme descrito anteriormente no item 5.5.2.

5.8 ISOLAMENTO EM CULTURA CELULAR

Para o isolamento viral foram utilizadas as alíquotas de ANF separadas para cultivo celular e armazenadas a -70°C , das amostras onde o hMPV foi detectado pela reação de RT-PCR para o gene N.

5.8.1 Cultivo convencional

O isolamento do hMPV foi realizado com a linhagem celular LLC-MK2 (células de rim de macaco *Rhesus*) passagem nº 62, onde foram inoculados 200 μL da amostra e incubado à 36°C com 1 mL de meio de manutenção viral (Meio Mínimo

Essencial Gibco com 2 mg/mL de tripsina TPCK - Sigma), conforme descrito por Mirazo *et al.* (2005). As células foram observadas em microscópio de campo invertido duas vezes por semana em busca de efeito citopático, durante um período de até 30 dias ou descolamento das células do tubo de cultura. Em casos de descolamento das células 200 µl do sobrenadante foi reinoculado. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante da cultura foram retirados semanalmente para identificação do isolado viral pela metodologia de RT-PCR para o gene N.

5.8.2 Cultivo pela metodologia da centrifugação rápida (*Shell vial*)

A metodologia de cultivo rápido em *Shell vial* foi realizada nas linhagens LLC-MK2 (passagem nº 63) e HEp-2 (passagem nº 85) cultivadas em placas de cultura celular de 24 poços. Foram inoculados 200 µL da amostra e centrifugados a 700 x g por 45 minutos. Após foi adicionado 1 mL de meio de manutenção viral (Meio Mínimo Essencial Gibco com 1% de soro bovino fetal *ICN Biomedicals Inc* e 2 µg/mL de tripsina TPCK - Sigma) e incubadas a 36°C, conforme descrito por Reina *et al.* (2007). As células foram observadas em microscópio de campo invertido a cada dois dias em busca de efeitos citopáticos. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram retiradas nos 3 primeiros dias após inoculação e depois a cada 5 dias até completar 30 dias de incubação ou descolamento das células do poço de cultura. Em casos de descolamento das células 200 µL do sobrenadante foi reinoculado. Estas alíquotas foram analisadas pela metodologia de RT-PCR para o gene N do hMPV para identificação do isolado viral.

5.9 SUBTIPAGEM DO hMPV

5.9.1 Determinação dos subtipos do hMPV por meio da metodologia de PCR-RFLP

A reação de PCR-RFLP foi realizada com o produto de PCR do gene F, obtido pela técnica de *Nested-PCR* conforme descrito por Kaida *et al.* (2006).

Os cDNAs das amostras positivas para hMPV (detectadas pelo RT-PCR para o gene N) foram amplificados para detectar uma região do gene da proteína de fusão (F) (posições 3728-4168 nucleotídeos, baseado na sequência AY297749) de 440pb. Para tanto, 2,5 µL do cDNA foi usado em 25 µL de reação contendo os seguintes reagentes: 2,5 µL de 10x *PCR buffer* menos Mg (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 0,75 µL de 50 mM MgCl₂ (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 4 µL de 2,5 mM dNTPs, 10 pmol de cada um dos iniciadores FF1 (5' - CWTTRGACYTAATGACWGATG - 3') e RR1 (5' - GTCTTCCTGTGCTRACTTTG - 3'), 1,25 U de *Taq Polimerase* (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA) e o volume completado com água destilada. A amplificação ocorreu com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O segundo PCR foi realizado para detectar uma região mais interna do gene da proteína F (posições 3765-4113, baseado na sequência AY297749) de 348 pb. Para tanto, 1 µL do primeiro PCR foi usado em 25 µL de reação contendo os seguintes reagentes: 2,5 µL de 10x *PCR buffer* menos Mg (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 0,75 µL de 50 mM MgCl₂ (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 4 µL de 2,5 mM dNTPs, 10 pmol de cada um dos iniciadores FF2 (5' - CATGCCRACATCTGCAGG - 3') e RR2 (5' - YTCCYTTGAYTGCTCAGCAAC- 3'), 1,25 U de *Taq Polimerase* (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA) e o volume completado com água destilada. A amplificação ocorreu com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos,

anelamento dos iniciadores a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto do segundo PCR foi analisado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, separados com uma voltagem de 100 V por aproximadamente 45 minutos. A visualização do produto de 348 pb foi realizada sob luz ultravioleta, com auxílio do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies) aplicado juntamente no gel.

A subtipagem por PCR-RFLP foi realizada digerindo 8 µL do produto do segundo PCR para o gene F (348 pb) com 15 U da enzima *Tsp509I* durante 1 hora à 65°C.

Os fragmentos resultantes foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 3,0% (Sigma Chemical) em tampão de corrida: 1000 mL de TBE 1X (Tri-borato 0,09M e EDTA 0,002M) (Gibco BRL) pH 8,0 + 0,1 µL/mL de brometo de etídio, e visualizados sob luz ultravioleta. Foi utilizado na corrida eletroforética, juntamente com as amostras, um marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies). A corrida foi desenvolvida a 100 V/cm, por aproximadamente 45 minutos.

O resultado dessa digestão foi comparado com os padrões de digestão descritos por Montes *et al.* (2007) para determinação dos subtipos de hMPV: subtipo A1 (dois fragmentos: 102 e 246 pb); subtipo A2a (dois fragmentos: 76 e 219 pb); subtipo A2b (um fragmento de 295 pb); subtipo B1 (3 fragmentos: 77, 116, 153 pb) e subtipo B2 (2 fragmentos: 153 e 193 pb), com a utilização do *software E-capt version 12.7 for Windows 2004-2005*.

5.9.2 Determinação dos subtipos do hMPV por meio de seqüenciamento genético

Para a determinação dos subtipos de hMPV detectados, foram seqüenciados os produtos de PCR obtidos para os genes F (produto do primeiro PCR) e N do genoma viral.

Os produtos de PCR obtidos para os genes F e N foram purificados utilizando os kits *Pure Link™ Quick gel Extraction kit* (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA) ou *NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel), de acordo com as

informações do fabricante. O produto purificado foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* e uma concentração final de 5 a 10 ng de DNA foram utilizadas para o seqüenciamento genético do gene F e de 10 a 20 ng de DNA para o gene N. Ambas as fitas foram seqüenciadas com os iniciadores utilizados na reação de PCR. Para o seqüenciamento foi utilizado o *kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standard* (Applied Biosystems Division, Foster City, CA), com o seguinte protocolo para 20 µL de volume final de reação: 4 µL de *Big Dye Terminator v3.1*, 2 µL de *BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer 5X*, 3,2 pmol de cada um dos iniciadores/reação, pelo menos 5 µL da concentração estipulada do produto de PCR purificado e o volume completado com água destilada. A reação de seqüenciamento ocorreu com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, sendo que a rampa de alteração da temperatura foi de 1°C/segundo.

Os fragmentos obtidos da reação de seqüenciamento foram purificados com 125 µL de isopropanol a 75% e centrifugados a 13.000 - 14.000 g durante 40 minutos para precipitação do material genético. O sobrenadante foi descartado e o sedimento desnaturado e solubilizado com 10 µL de formamida *HiDi* (Applied Biosystems Inc., CA) a 94°C por 2 minutos e analisados no equipamento ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., CA) com capilar de 50 cm de comprimento e polímero POP 7 (Applied Biosystems Inc., CA). As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com seqüências previamente publicadas de hMPV, utilizando a ferramenta BLAST (*nucleotide-nucleotide BLAST – blastn*) disponível no *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Para a análise filogenética foram selecionadas seqüências nucleotídicas dos genes estudados disponíveis no banco de dados do *GenBank*, com os seguintes números de acesso: EU857607 (TN/85/4-17), EU857582 (TN/95/2-52), EU857572 (TN/87/2-7), EU857573 (TN/88/4-21), EU857548 (TN/94/7-11), EU857544 (TN/94/9-11), EU857553 (TN/00/3-14), EU857551 (TN/92/2-50), EU857566 (TN/85/6-3), EU857564 (TN/86/3-14) para o gene F, conforme descrito por Yang *et al.* (2009) e AY145285 (CAN98-79), AY145281 (CAN98-75), AY145280 (CAN98-74), AY145279 (CAN98-73), AY145274 (CAN00-14), AF371337 (NL/00-1), AY145277 (CAN97-82),

AY525843 (NL/1/99), EU179266 (LIV03-315), AY145276 (CAN00-16), AY530095 (JPS03-240), AY145272 (CAN00-12), AY145276 (CAN00-16) para o gene N, conforme descrito por Huck *et al.* (2006). Como grupo controle foi utilizado o APV tipo C: EF199771 e EF199772 para o gene F e AY590688 para o gene N. As seqüências foram alinhadas com o software *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) e analisada pelo método *bootstrapped neighbor-joining* (2.000 réplicas), usando a *complete deletion* e os parâmetros de Kimura-2 do software MEGA v.4 (KIMURA, 1980; TAMURA *et al.*, 2007).

Para análise de similaridade e identidade das seqüências obtidas foram utilizados o software *Bioedit version 7.0.9.0* e as seguintes seqüências como referência para o gene F (EU857548, representando o subtipo A1; EU857551, representando o subtipo A2a; EU857564, representando o subtipo A2b; EU857572, representando o subtipo B1 e EU857582, representando o subtipo B2) e para o gene N (AY145274, representando o subtipo A1; AY145276, representando o subtipo A2a; EU179266, representando o subtipo A2b; AY525843, representando o subtipo B1 e AY145281, representando o subtipo B2).

5.10 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

O protocolo para detecção do hMPV (APÊNDICE 1) foi utilizado para a reação de RT-PCR para detecção do gene N. Para identificação das amostras de ANF analisadas, as mesmas seguiram a numeração do registro do laboratório de virologia.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes infectados por hMPV foram obtidos nos prontuários médicos arquivados na instituição ou disponíveis no prontuário eletrônico da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba e registrados em formulários específicos (APÊNDICES 2, 3 e 4). Os instrumentos de coleta de dados foram validados após adequações às estruturas dos prontuários.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e demográficos foram comparados com a subtipagem do hMPV usando uma planilha do *Microsoft Office Excel 2007*. As análises estatísticas foram realizadas usando os testes de *Q-quadrado* para comparar proporções, teste exato de *Fisher* para comparar as médias e o teste de *Wilcoxon* para comparar as medianas, com o auxílio do *software Graph Pad Prism* versão 3.00 para *Windows*, *GraphPad Software*, San Diego, California USA. Em todas as análises um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR PARA O GENE N DO hMPV

O laboratório de virologia do HC-UFPR não dispunha de uma amostra sabidamente positiva para o hMPV de modo a servir como controle positivo. Desse modo, a reação de RT-PCR seguindo o protocolo descrito por Mirazo *et al.* (2005), foi realizada em um grupo aleatório de amostras de ANF coletadas no período de inverno dos anos de 2000 a 2005 até se obter um produto de PCR do tamanho esperado (928 pb). Esse produto foi caracterizado e usado para a produção do controle positivo e padronização da metodologia de RT-PCR para o gene N do hMPV.

Para a produção desse controle, uma amostra previamente positiva (nº 1853/2000) (FIGURA 15) foi purificada (FIGURA 16) e clonada em vetor *pGEM-T* (*Easy Vector Systems*). Para confirmar a ligação, além da seleção *Lac* (devido a presença no sítio de clonagem do vetor *pGEM-T* do gene *Lac Z* – FIGURA 14), realizou-se a técnica de PCR de colônia (FIGURA 17). Selecionaram-se as colônias 3, 5 e 10 para realização do pré-inóculo e posterior mini-preparação, por apresentarem uma banda com intensidade mais forte do que as demais colônias.

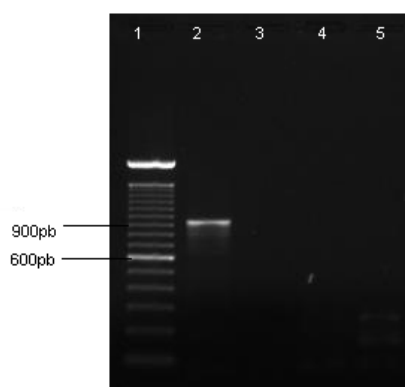


FIGURA 15 – DETECÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA (N: 928pb) DO hMPV ATRAVÉS DA ANÁLISE DO GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: Padrão de massa molecular *100pb DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies); Linha 2: amostra nº 1853 coletada em 2000; Linha 3: amostra nº 1041 coletada em 2001; Linha 4: amostra nº 1298 coletada em 2002; Linha 5: controle negativo.

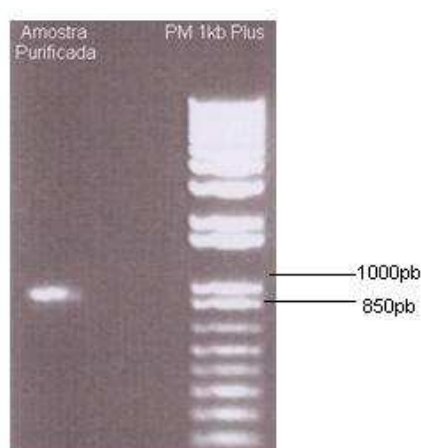


FIGURA 16 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O PRODUTO DE RT-PCR (GENE N DO hMPV) APÓS A PURIFICAÇÃO COM O *HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT* (Roche Inc., Valencia, CA)

FONTE: O autor (2010)

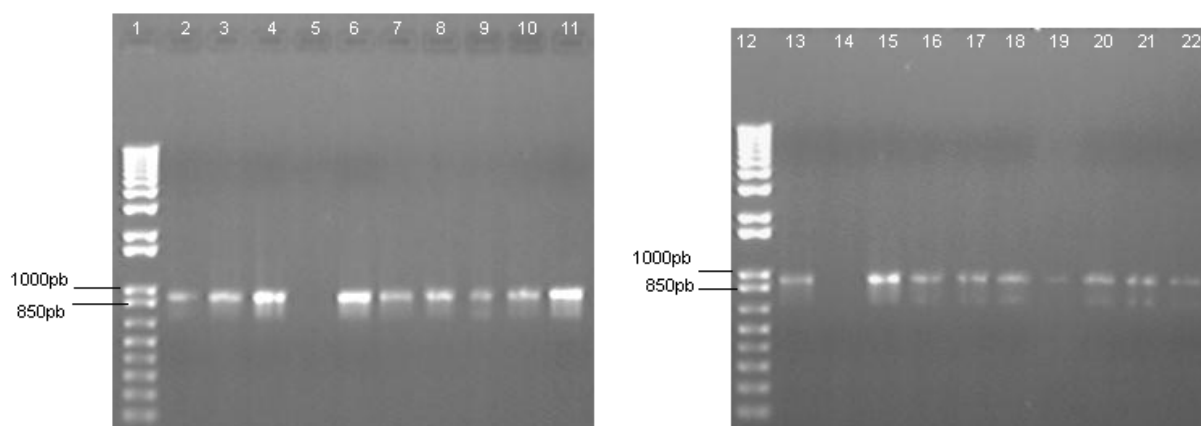


FIGURA 17 – GEL DE AGAROSE 1% CORADOS COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O RESULTADO DA REAÇÃO DE PCR ESPECÍFICA PARA O GENE N DO hMPV REALIZADA A PARTIR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS *E. COLI TOP 10F'* TRANSFORMADAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: Padrão massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2 – 11: colônias 1 – 10, respectivamente. Linha 12: Padrão massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 13 - 22: colônias 11 – 20, respectivamente.

Também para a verificação do inserto, realizou-se a digestão das três mini-preparações com a enzima *Eco R1* que apresenta como seqüência de reconhecimento os nucleotídeos GAATTC. A Figura 18 representa o gel de agarose obtido desta digestão, onde é possível verificar uma banda fraca em cada digestão entre as bandas de 850 e 1.000 pb, possivelmente a do inserto e uma banda mais

acima representando o plasmídeo *pGEM-T* contendo o inserto (3.018 pb + 928 pb = 3.946pb).

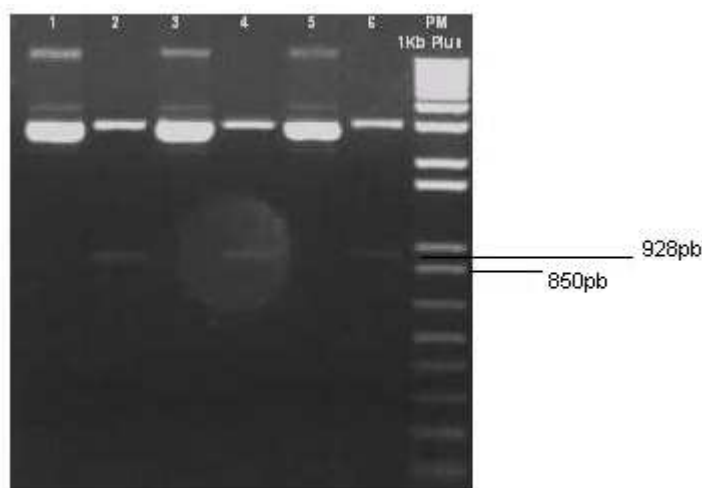


FIGURA 18 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO ONDE SE VISUALIZA A DIGESTÃO COM A ENZIMA *ECO R1* DO VETOR *PGEM-T EASY* CONTENDO O INSERTO DE 928 PB DO GENE N DO hMPV

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: Miniprep colônia 3; Linha 2 – Digestão colônia 3; Linha 3: Miniprep colônia 5; Linha 4: Digestão colônia 5; Linha 5: Miniprep colônia 10; Linha 6: Digestão colônia 10.

O seqüenciamento nucleotídico confirmou a identidade do produto de PCR como uma amostra positiva para hMPV. A comparação desta seqüência com outras disponíveis no *GenBank* para o gene N do hMPV que representam ambos os grupos, A (A1 e A2) e B (B1 e B2) confirmaram a identidade do fragmento amplificado e classificaram a amostra. A identidade nucleotídica entre hMPV Curitiba e as amostras do subtipo A1 foi de 97,2-98,2%, com o subtipo A2 foi de 91,7-92,0% e diminui para 83,4-84,0% com o subtipo B1 e 83,7-84,6% com o subtipo B2. Estes resultados e o alto valor de *bootstrap* na árvore filogenética confirmaram que o hMPV detectado em Curitiba no ano de 2000 pertence ao genótipo A subtipo 1 (FIGURA 19).

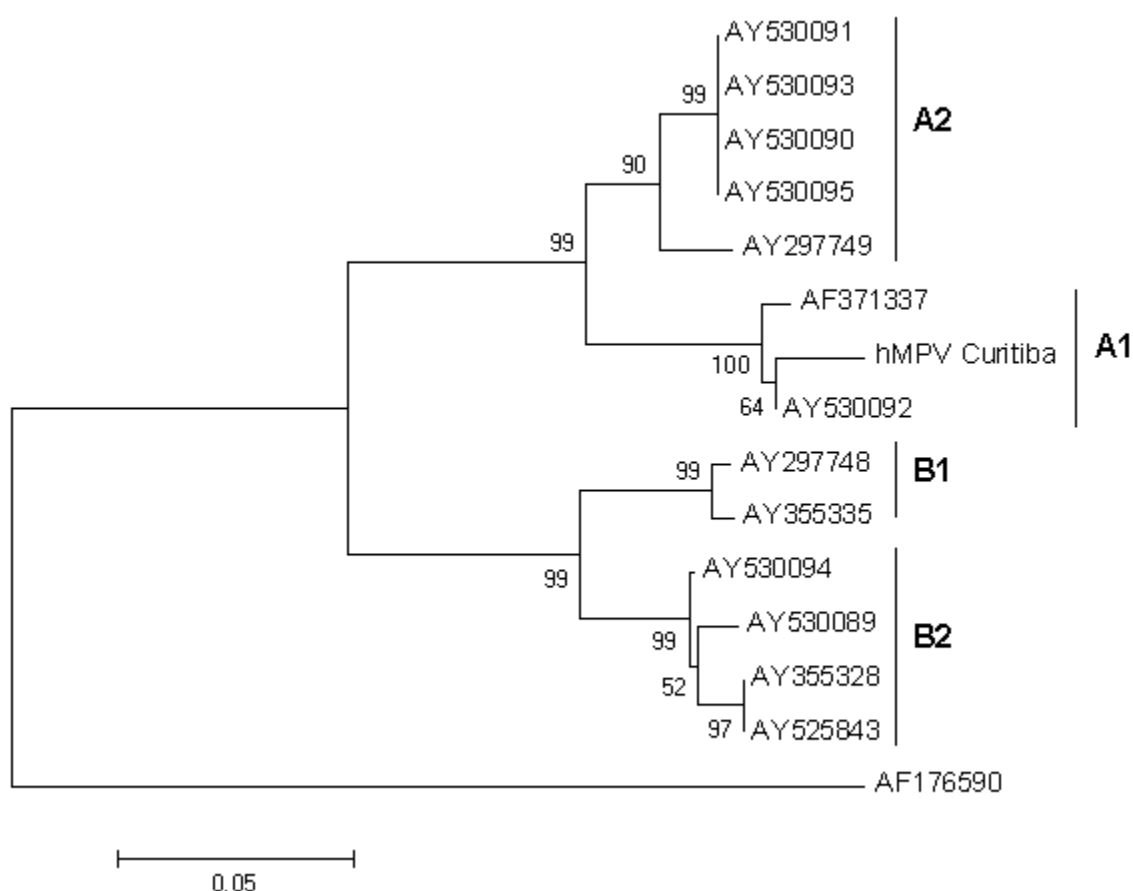


FIGURA 19 – ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA PARCIAL DO hMPV DETECTADO NO ANO 2000 EM CURITIBA E DE MAIS SEQUÊNCIAS DO GENE N DO hMPV OBTIDAS NO GENBANK

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Foi utilizado o método *neighbor-joining* com 1.000 réplicas do software MEGA v.3. Valores de *bootstrap* são indicados em cada nó da árvore.

O limite de detecção do ensaio padronizado foi de 180 cópias/μL. Este número de cópias foi calculado com base na concentração do plasmídeo determinado por espectrofotometria (78 ng/μL de DNA) e diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-10} do plasmídeo recombinante. A Figura 20 mostra a sensibilidade de detecção (número de cópias/reação) do plasmídeo controle na reação de PCR (de $1,8 \times 10^8$ até $1,8 \times 10^2$ cópias). A diluição $1,8 \times 10^5$ foi escolhida para ser usada como controle positivo nas demais reações de PCR para detecção do gene N.

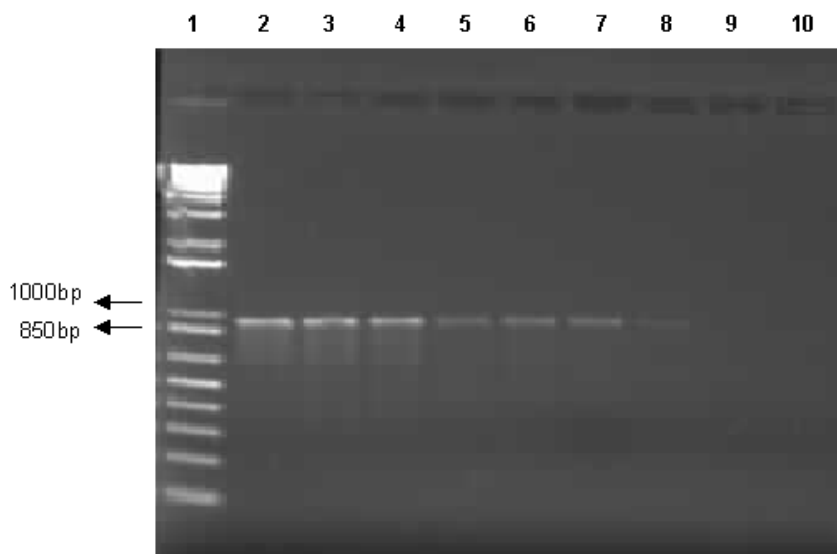


FIGURA 20 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O LIMITE DE SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE PCR PARA hMPV UTILIZANDO UMA DILUIÇÃO SERIADA DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2: $1,8 \times 10^8$ cópias; Linha 3: $1,8 \times 10^7$ cópias; Linha 4: $1,8 \times 10^6$ cópias; Linha 5: $1,8 \times 10^5$ cópias; Linha 6: $1,8 \times 10^4$ cópias; Linha 7: 1800 cópias; Linha 8: 180 cópias; Linha 9: 18 cópias; Linha 10: controle negativo.

De modo a determinar se ocorria inibição da reação de PCR para o gene N pela quantidade de PRV (controle interno) presente no tampão de extração, 500 cópias do PRV foram adicionadas a cada uma das concentrações da diluição seriada do plasmídeo recombinante 10^{-2} a 10^{-10} . A Figura 21 mostra os resultados desta reação de PCR, onde se observa que as 500 cópias do controle interno, presente no tampão de extração, não inibiram a detecção da menor concentração do plasmídeo detectado (180 cópias), no entanto, a concentração de $1,8 \times 10^8$ cópias do plasmídeo recombinante inibiu a detecção do PRV.

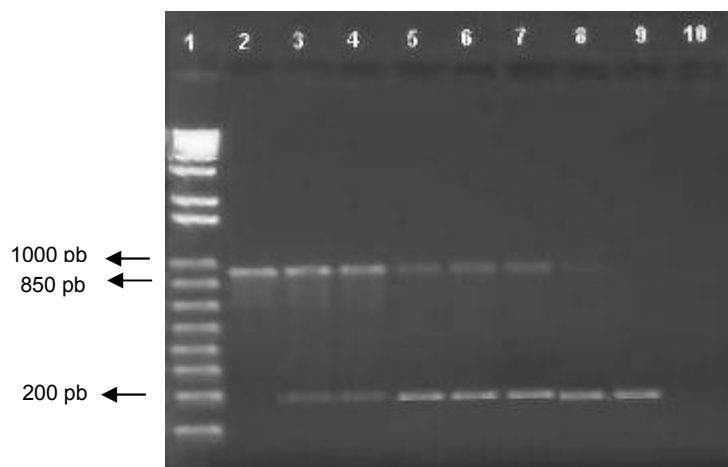


FIGURA 21 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO QUE 500 CÓPIAS DO PRV ADICIONADO AO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO (BANDA DE 190 pb) NÃO INIBE A DETECÇÃO DO GENE N DO hMPV

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2: $1,8 \times 10^8$ cópias; Linha 3: $1,8 \times 10^7$ cópias; Linha 4: $1,8 \times 10^6$ cópias; Linha 5: $1,8 \times 10^5$ cópias; Linha 6: $1,8 \times 10^4$ cópias; Linha 7: 1800 cópias; Linha 8: 180 cópias; Linha 9: 18 cópias; Linha 10: controle negativo.

A metodologia de RT-PCR para detecção da nucleoproteína do hMPV não amplificou outros vírus respiratórios (FLU A, FLU B, AdV, hRSV, PIV1, PIV2 e PIV3) detectados por imunofluorescência indireta, mostrando uma especificidade de 100%, como pode ser observado na Figura 22, onde apenas foi detectado o PRV (controle interno) com 190 pb.



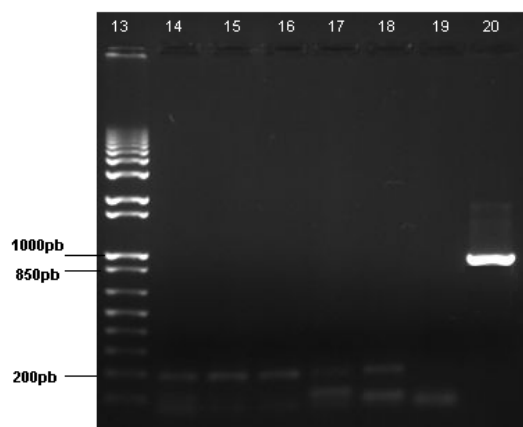


FIGURA 22: GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DE ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE PCR PARA hMPV UTILIZANDO AMOSTRAS POSITIVAS PARA OUTROS VÍRUS RESPIRATÓRIOS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linhas 1 e 13: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linhas 2 e 3: Amostras FLU A, Linhas 3 e 4: Amostras FLU B, Linhas 5 e 6: Amostras AdV, Linhas 7 a 9: Amostras hRSV, Linhas 10 e 11: Amostras PIV 1; Linhas 14 e 15: Amostras PIV2, Linhas 16 e 17: Amostras PIV3, Linha 18: Controle negativo com PRV, Linha 19: Controle negativo sem PRV, Linhas 12 e 20: Controle positivo.

A técnica de RT-PCR assim padronizada para detecção de um segmento de 928pb (posições 112–1040 nucleotídeos, baseado na sequência AY297749) do gene da nucleoproteína (N) do hMPV foi aplicada nas 1.572 amostras de ANF recebidas no laboratório de virologia entre os anos de 2006 a 2008. A mesma mostrou-se eficiente na amplificação de 61 amostras de ANF. Além disso, as modificações implementadas na técnica descrita por Mirazo *et al.*, (2005) mostraram-se eficientes, sendo a técnica padronizada simples, rápida e reprodutível para amplificação parcial do gene N do hMPV.

6.2 SUBTIPAGEM DOS hMPV DETECTADOS

Nenhuma amostra positiva para hMPV foi isolada em cultivo celular com as linhagens LLC-MK2 e HEp-2, tanto pelo método convencional quanto pelo método de centrifugação rápida (*Shell vial*). Por tal motivo, a subtipagem das mesmas foi realizada diretamente das amostras clínicas, pelas técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento genético.

6.2.1 Subtipagem pela técnica de PCR-RFLP

O protocolo descrito por Kaida *et al.* (2006) foi testado com uma amostra positiva para o hMPV detectada pelo RT-PCR para o gene N (nº 3397/06) para verificar se as condições descritas na reação seriam adequadas e reprodutíveis no laboratório de virologia do HC-UFPR. Conforme mostra a Figura 23, as condições da reação mostraram-se eficientes para amplificação do gene F do hMPV e foram utilizadas em todas nas 61 amostras positivas para hMPV detectadas pelo RT-PCR para o gene N.

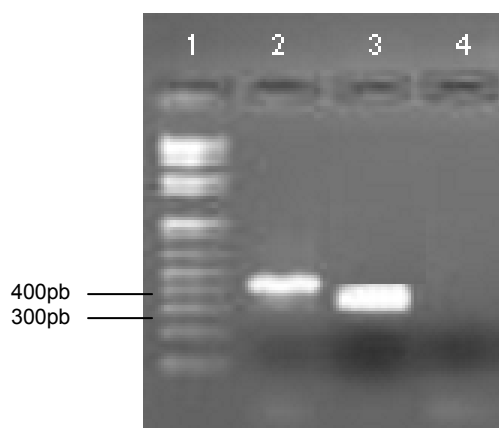


FIGURA 23 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DE UMA AMOSTRA POSITIVA PARA hMPV (Nº 3397/06) COM O PROTOCOLO DESCRITO POR KAIDA *et al.* (2006) PARA DETECÇÃO DO GENE F

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linha 1: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2: Produto do primeiro PCR (440pb), Linha 3: Produto do segundo PCR (348pb), Linha 4: Controle negativo (água).

O produto do segundo PCR da amplificação do gene F foi digerido com a enzima de restrição *TSP 509I*, que apresenta como sequência de reconhecimento os nucleotídeos AATT, e o resultado foi analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e a massa molecular de cada uma das bandas detectadas foi determinada pelo *software E-capt version 12.7 for Windows 2004-2005*. Esta metodologia mostrou-se eficiente na subtipagem de 5 (5/61 – 8,2%) amostras. A digestão só ocorreu nas amostras que apresentavam uma maior intensidade da banda de amplificação do gene F.

Pela metodologia de PCR-RFLP foram detectados os genótipos B2 e A2a, sendo três amostras B2 no ano de 2006, uma mostra B2 no ano de 2007 e uma amostra A2a no ano de 2008 (FIGURA 24).

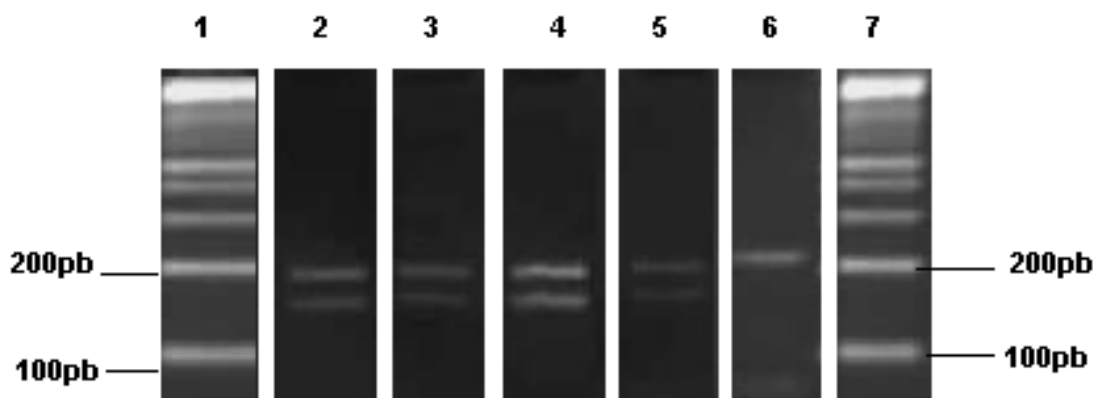


FIGURA 24 - GEL DE AGAROSE 3% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO COM A GENOTIPAGEM DOS hMPV DETECTADOS PELA METODOLOGIA DE PCR-RFLP

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Linhas 1 e 7: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2: Amostra nº 2387/06 – B2, Linha 3: Amostra nº 2740/06 – B2, Linha 4: Amostra nº 3397/06 – B2, Linha 5: Amostra nº 752/07 – B2, Linha 6: Amostra nº 2311/08 – A2a.

6.2.2 Subtipagem pelo seqüenciamento genético

O seqüenciamento parcial dos genes F e/ou N foi realizado diretamente do produto de PCR purificado e quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000*.

A purificação do produto de PCR foi realizada por duas metodologias, dependendo das características do produto de PCR. O kit *Pure Link™ Quick gel Extraction* foi utilizado nos casos da amplificação do gene ter gerado bandas inespecíficas, sendo que nestes casos o fragmento de DNA do tamanho esperado foi cortado do gel de agarose, extraídos e purificados com o *kit*. Nos casos de detecção única e específica do fragmento de DNA do tamanho esperado, o mesmo foi purificado diretamente com o kit *NucleoSpin® Extract II*. A maioria dos produtos de PCR (51/82 – 62,2%) foi purificada pelo *kit NucleoSpin® Extract II*, sendo que o seqüenciamento nucleotídico foi obtido das 51 amostras. Dentre os 13 produtos de PCR purificados com o *kit Pure Link™ Quick gel Extraction* e submetidos ao

seqüenciamento genético, em apenas 3 (3/13 - 23,1%) amostras obteve-se o seqüenciamento nucleotídico.

O Apêndice 5 mostra dados sobre a metodologia de purificação utilizada, quantificação do DNA purificado e o resultado do seqüenciamento genético. De um modo geral, apenas amostras que apresentaram uma quantificação do DNA purificado maior que 3 ng/μL resultaram em um seqüenciamento genômico com resolução.

Obteve-se o seqüenciamento nucleotídico de 51 (51/61 – 83,6%) amostras positivas para hMPV. Trinta e nove amostras foram seqüenciadas para o gene F e quinze para o gene N. Apenas três amostras foram seqüenciadas para ambos os genes. No total foram seqüenciadas 11 (11/14 – 78,6%) amostras do ano 2006, 31 (31/37 – 83,8%) amostras do ano 2007 e 9 (9/10 – 90%) amostras do ano 2008.

As seqüências obtidas foram submetidas ao *GenBank* com os seguintes números de acesso: HM124479 a HM124528 e HM173093 a HM173096. As mesmas foram alinhadas com seqüências previamente publicadas de hMPV, utilizando a ferramenta BLAST (*nucleotide-nucleotide BLAST – blastn*) disponível no *GenBank*, o que permitiu confirmar a identidade dos produtos de PCR obtidos como amostras positivas para hMPV.

A determinação do subtipo dos hMPVs detectados foi realizado através da análise da similaridade das seqüências obtidas com as seqüências referências disponíveis no *GenBank* para cada subtipo, bem como da análise da árvore filogenética construída com as seqüências nucleotídicas obtidas para o gene F e N. As Tabelas 2 e 3 mostram as amostras com maior e menor similaridade nucleotídicas e aminoacídicas detectadas neste estudo, respectivamente para os genes F e N. Estes resultados e o alto valor do *bootstrap* nas árvores filogenéticas confirmam os subtipos detectados (FIGURAS 25 e 26).

TABELA 2: SIMILARIDADE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS E NUCLEOTÍDICAS DO GENE F ENTRE AS AMOSTRAS DE hMPV DETECTADAS EM CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 E SEQÜÊNCIAS REFERÊNCIAS DEPOSITADAS NO GENBANK.

AMOSTRAS	% Similaridade Gene F																	
	A1	A2a	A2b	B1	B2	BR/PR 488/06	BR/PR 2387/06	BR/PR 2410/06	BR/PR 3397/06	BR/PR 741/07	BR/PR 752/07	BR/PR 1198/07	BR/PR 1503/07	BR/PR 1608/07	BR/PR 2590/07	BR/PR 161/08	BR/PR 967/08	
A1		95,8	97,5	86,6	92,4	100	92,4	100	92,4	87,3	92,4	92,4	92,4	92,4	89,9	100	100	
A2a	100		97,5	92,4	92,4	100	92,4	100	92,4	87,3	92,4	92,4	92,4	92,4	89,9	100	100	
A2b	94,8	96,2		85,5	85,0	97,5	92,3	97,5	92,3	87,2	92,3	92,3	92,4	92,4	89,8	97,5	97,5	
B1	92,4	84,4	92,4		97,5	92,4	97,5	92,4	97,5	97,0	97,5	97,5	100	95,0	97,5	92,4	92,4	
B2	85,0	85,0	92,3	96,3		92,4	100	92,4	100	98,5	100	100	97,5	92,5	98,0	92,4	92,4	
BR/PR 488/06	96,2	96,8	94,8	86,6	86,1		92,4	100	92,4	87,3	92,4	92,4	92,4	92,4	89,9	100	100	
BR/PR 2387/06	86,0	86,1	87,1	96,3	98,2	87,1		86,6	100	92,5	100	100	97,5	92,5	95,0	92,4	92,4	
BR/PR 2410/06	99,5	95,3	94,4	87,1	85,5	97,7	92,4		92,4	87,3	92,4	92,4	92,4	92,4	89,9	100	100	
BR/PR 3397/06	85,5	85,5	86,6	96,8	98,6	86,6	99,5	86,0		92,5	100	100	97,5	92,5	95,0	92,4	92,4	
BR/PR 741/07	84,4	84,5	85,5	94,8	95,8	85,5	95,8	85,0	96,3		92,5	92,5	95,0	89,9	97,5	87,3	87,3	
BR/PR 752/07	85,0	85,0	86,0	97,2	99,1	86,0	99,1	85,5	99,5	96,7		100	97,5	92,5	95,0	92,4	92,4	
BR/PR 1198/07	85,0	85,0	86,0	97,2	99,1	86,0	99,1	85,5	99,5	96,7	100		97,5	92,5	95,0	92,4	92,4	
BR/PR 1503/07	86,6	84,4	85,5	100	96,3	86,6	96,3	87,1	96,6	94,8	97,2	97,2		95,0	97,7	92,4	92,4	
BR/PR 1608/07	85,5	83,3	84,4	98,2	94,4	86,5	94,4	86,0	94,9	92,9	95,3	95,3	98,2		95,8	92,4	92,4	
BR/PR 2590/07	85,5	84,4	85,5	97,7	98,7	85,5	97,7	86,0	98,2	97,2	98,6	98,6	97,5	92,5		89,9	89,9	
BR/PR 161/08	96,3	99,6	97,7	83,9	84,4	97,2	85,5	95,8	85,0	83,9	84,4	84,4	83,9	82,8	83,9		100	
BR/PR 967/08	95,3	99,6	97,7	83,9	84,5	96,3	85,5	94,8	85,0	83,9	84,4	84,4	83,9	82,8	83,9	99,1		

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os dados estão demonstrados como % de Similaridade nucleotídica (abaixo) e aminoacídica (acima). Foram utilizadas como referência as seguintes seqüências: A1 (EU857548), A2a (EU857551), A2b (EU857564), B1 (EU857572) e B2 (EU857582).

TABELA 3: SIMILARIDADE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS E NUCLEOTÍDICAS DO GENE N ENTRE AS AMOSTRAS DE hMPV DETECTADAS EM CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 E SEQÜÊNCIAS REFERÊNCIAS DEPOSITADAS NO GENBANK.

AMOSTRAS	% Similaridade Gene N															
	A1	A2a	A2b	B1	B2	BR-PR/2681/06	BR-PR/2740/06	BR-PR/2894/06	BR-PR/2961/06	BR-PR/1053/07	BR-PR/1473/07	BR-PR/1606/07	BR-PR/1626/07	BR-PR/2590/07	BR-PR/2633/07	BR-PR/1113/08
A1	100	100	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100
A2a	95,4	100	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100
A2b	95,4	98,7	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100
B1	83,1	84,9	86,4	100	100	100	100	100	92,8	100	100	100	100	100	100	92,8
B2	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	92,8	100	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/2681/06	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	92,8	100	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/2740/06	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	92,6	92,6	100	100	92,8
BR-PR/2894/06	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	92,8	100	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/2961/06	100	95,4	95,4	83,1	81,7	81,7	92,8	81,7	100	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	100
BR-PR/1053/07	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/1473/07	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/1606/07	83,1	84,9	86,4	100	92,6	92,6	100	92,6	83,1	92,6	92,6	100	100	100	100	92,8
BR-PR/1626/07	83,1	84,9	86,4	100	92,6	92,6	100	92,6	83,1	92,6	100	100	100	100	100	92,8
BR-PR/2590/07	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	92,6	92,6	100	100	92,8
BR-PR/2592/07	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	92,6	92,6	100	100	92,8
BR-PR/2633/07	81,7	83,4	83,4	92,6	100	100	100	100	81,7	100	100	92,6	92,6	100	100	92,8
BR-PR/1113/08	95,4	100	98,7	84,9	83,4	83,4	83,4	83,4	95,4	83,4	83,4	84,9	84,9	83,4	83,4	83,4

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os dados estão demonstrados como % de Similaridade nucleotídica (abaixo) e aminoacídica (acima). Foram utilizadas como referência as seguintes seqüências: A1 (AY145274), A2a (AY145276), A2b (EU179266), B1 (AY525843) e B2 (AY145281).

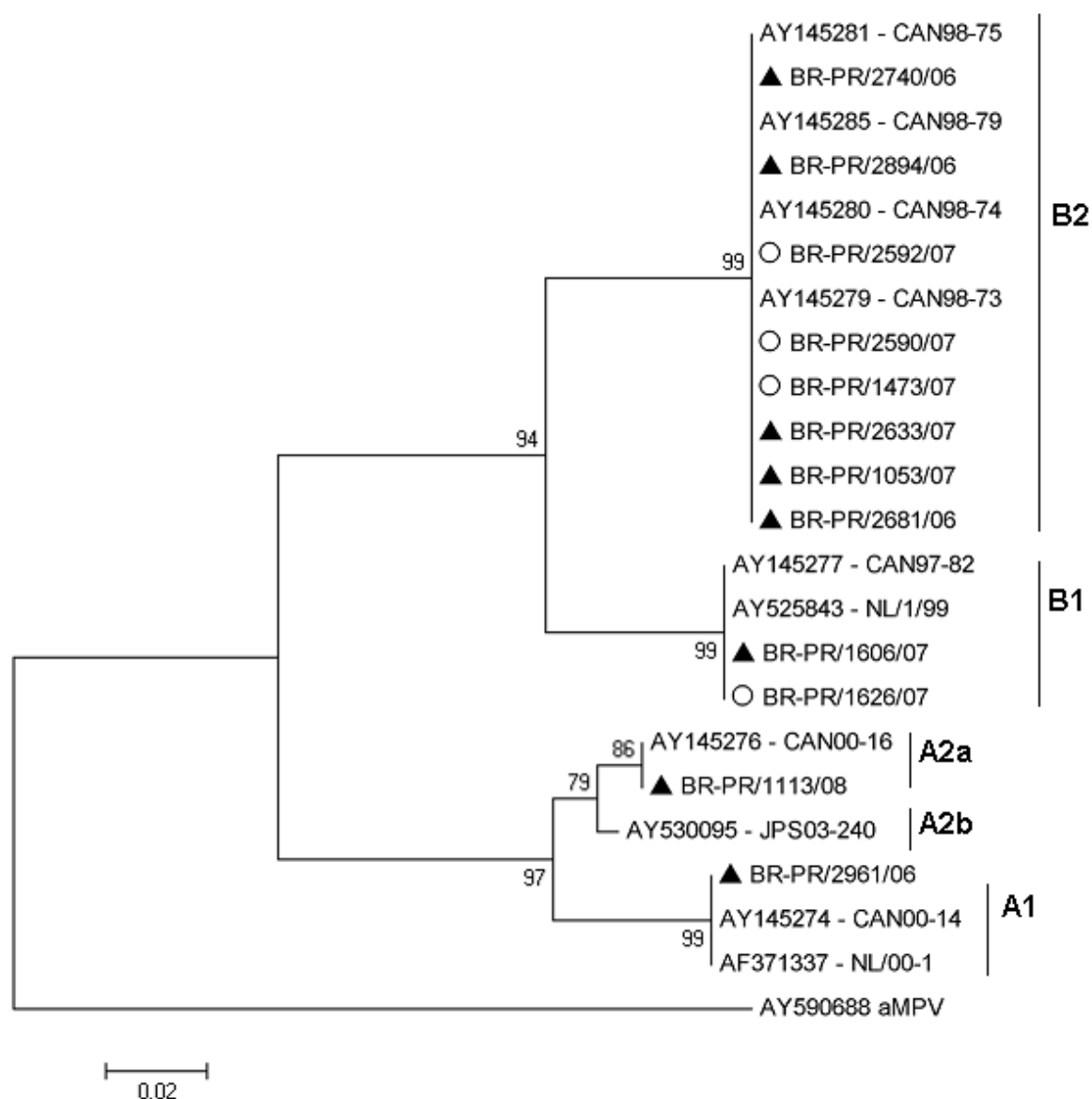


FIGURA 25 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS PARCIAIS (156nt) DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA (N) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006-2008 E DEMAIS SEQUÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO *GENBANK*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Foi utilizado o método *neighbor-joining* com 2.000 réplicas do *software* MEGA v.4. Valores de *bootstrap* estão indicados em cada nó da árvore. As sequências destacadas com um triângulo preto são referentes a amostras de pacientes hospitalizados e as que estão destacadas com um círculo são referentes a amostras de pacientes ambulatoriais. As amostras deste estudo foram nomeadas como BR-PR seguido do número do registro no laboratório e ano da coleta.

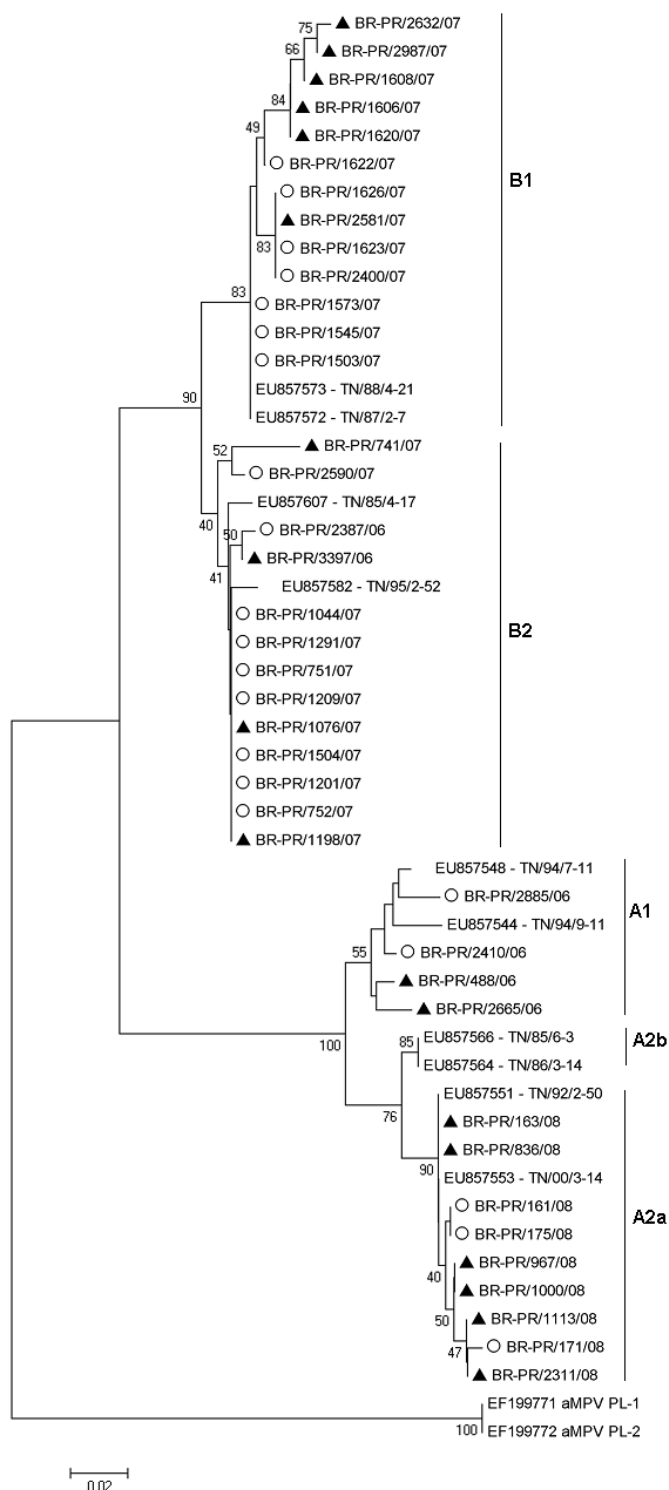


FIGURA 26 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS PARCIAIS (220nt) DO GENE DA PROTEÍNA DE FUSÃO (F) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006-2008 E DEMAIS SEQUÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO *GENBANK*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Foi utilizado o método *neighbor-joining* com 2.000 réplicas do *software* MEGA v.4. Valores de *bootstrap* maiores que 40% estão indicados em cada nó da árvore. As seqüências destacadas com um triângulo preto são referentes a amostras de pacientes hospitalizados e as que estão destacadas com um círculo são referentes a amostras de pacientes ambulatoriais. As amostras deste estudo foram nomeadas como BR-PR seguido do número de registro no laboratório e ano da coleta.

O subtipo A1 do hMPV foi detectado em 5 (5/51 – 9,8%), A2a em 9 (9/51 – 17,6%), B1 em 13 (13/51 – 25,5%) e B2 em 24 (24/51 – 47,1%) amostras. Os subtipos A1, A2a, B1 e B2 mostraram, respectivamente, 98-100%, 99-100%, 98-100% e 95-100% de similaridade nucleotídica com as seqüências referências de cada subtipo.

A identidade nucleotídica das seqüências parciais do gene F entre os genótipos A e B foi de 82,8-87,1%, enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 94,8–97,2% e 92,9-97,2%, respectivamente. Analisando a identidade nucleotídica de cada subtipo com as seqüências referência dos mesmos observa-se que os subtipos A1, A2, B1 e B2 apresentaram 98-99%, 99%, 98-100%, 98-99% de similaridade, respectivamente. A identidade aminoacídica entre os genótipos A e B foi de 87,3-92,4%, enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 97,5-100% e 92,5-97,5%, respectivamente. Entre os subtipos a identidade aminoacídica foi de 100%, 100%, 95-100% e 98-100%, respectivamente para os subtipos A1, A2, B1 e B2.

A identidade nucleotídica das seqüências parciais do gene N entre os genótipos A e B foi de 81,7-84,9%, enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 95,4% e 92,6%, respectivamente. A identidade nucleotídica entre cada subtipo detectado e as seqüências referências dos mesmos foi de 100%. A identidade aminoacídica entre os genótipos A e B foi de 92,8%, enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 100%. A identidade aminoacídica entre cada subtipo também foi de 100%.

Analisando os dados das árvores filogenéticas construídas com as amostras detectadas neste estudo, observa-se que não houve variabilidade nucleotídica significativa entre os subtipos de hMPV detectados entre os pacientes hospitalizados ou ambulatoriais durante os anos de 2006 a 2008. Estes dados estão demonstrados nas Figuras 25 e 26, onde as amostras de pacientes hospitalizados foram destacadas com um triângulo preto e as amostras dos pacientes ambulatoriais foram destacadas com um círculo.

O único subtipo do hMPV que foi detectado por um período maior do que um ano, foi o subtipo B2, sendo detectado em dois anos sucessivos (2006 e 2007). Conforme observado na Figura 25, as seqüências nucleotídicas do gene N foram idênticas para ambos os anos, e conseqüentemente o mesmo ocorreu para as seqüências aminoacídicas. No entanto, uma pequena variabilidade (95,8-99,5%) foi

observada quando comparamos as seqüências nucleotídicas do gene F entre as amostras do subtipo B2 detectadas nos anos de 2006 e 2007.

As amostras 741/07 (coletada em março de 2007 em um paciente hospitalizado na emergência pediátrica) e 2590/07 (coletada em agosto de 2007 em um paciente ambulatorial) do subtipo B2 apresentaram uma maior variabilidade nucleotídica (95,8 e 97,7%, respectivamente) e aminoacídica (92,5 e 95%, respectivamente) para o gene F, comparando com amostras de B2 do ano de 2006. As demais amostras do subtipo B2 demonstraram uma similaridade nucleotídica de 99,1-99,5% e aminoacídica de 100% entre os diferentes anos (Tabela 2 e FIGURA 26).

A presença dos nucleotídeos A e G diferentes dos demais na posição 71 e 81 da Figura 27A, explica o motivo das amostras 741/07 e 2590/07 estarem em um ramo diferente das demais seqüências do subtipo B2 do hMPV, porém esta diferença nucleotídica não é significativa, pois a topologia deste nó interno na árvore filogenética da Figura 26 é sustentado com apenas 52% das réplicas do *bootstrap*.

Árvores filogenéticas com as seqüências nucleotídicas traduzidas foram confeccionadas para verificar o significado da variabilidade nucleotídica observada. Analisando as árvores com as seqüências aminoacídicas parciais dos genes F (FIGURA 28) e N (FIGURA 29) é possível verificar que a maior variabilidade entre as seqüências é observada entre os genótipos A e B, não sendo possível subtipar os vírus, principalmente com as seqüências aminoacídicas da nucleoproteína.

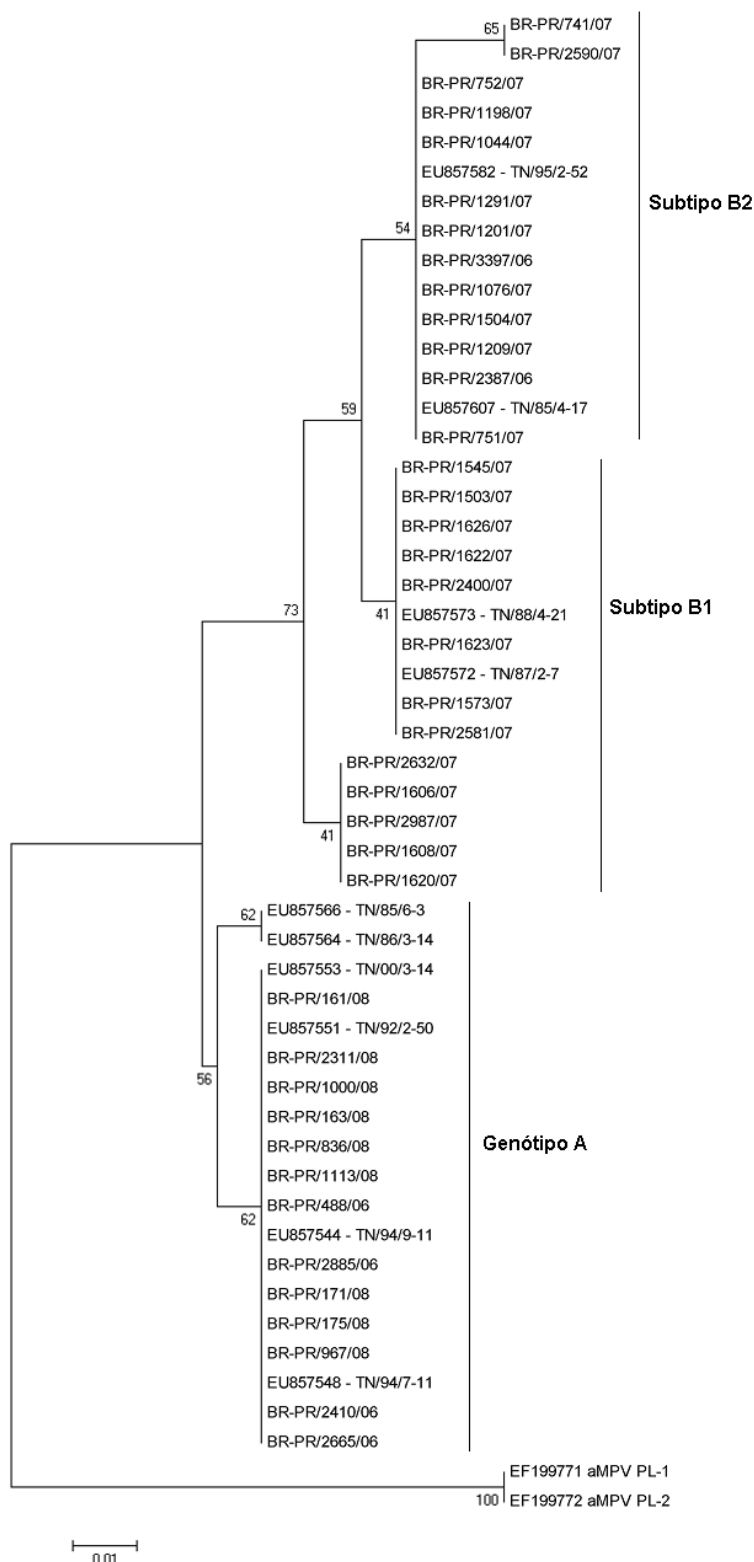


Figura 28 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS PARCIAIS (73aa) DA PROTEÍNA DE FUSÃO (F) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO *GENBANK*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Foi utilizado o método *neighbor-joining* com 2.000 réplicas do *software* Mega v.4. Valores de *bootstrap* maiores que 40% estão indicados em cada nó da árvore. As seqüências foram nomeadas como BR-PR seguido do número da amostra e ano da coleta.

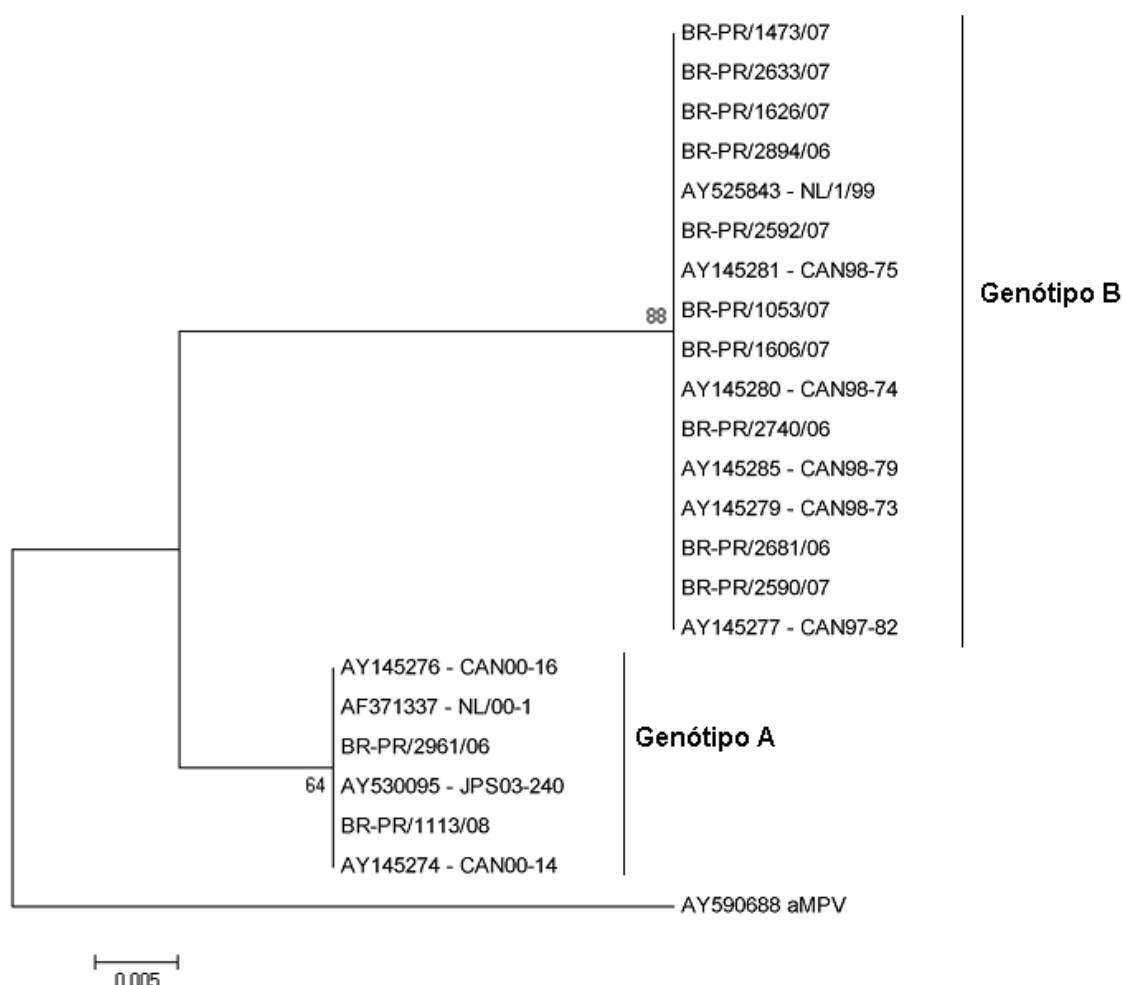


FIGURA 29 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS AMINOACÍDICAS PARCIAIS (52aa) DA NUCLEOPROTEÍNA (N) DOS hMPV DETECTADOS EM CURITIBA DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008 E DEMAIS SEQÜÊNCIAS DO hMPV OBTIDAS NO GENBANK

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Foi utilizado o método *neighbor-joining* com 2.000 réplicas do *software* MEGA v.4. Valores de *bootstrap* maiores que 40% estão indicados em cada nó da árvore. As seqüências foram nomeadas como BR-PR seguido do número da amostra e ano da coleta.

6.3 DETECÇÃO DO hMPV NAS AMOSTRAS ANALISADAS

Entre os anos de 2006 a 2008, o laboratório de virologia do HC-UFPR recebeu 1.572 amostras de ANF de 1.222 pacientes. Destas amostras, 1.079 (1.079/1.572 - 68,6%) foram provenientes de pacientes hospitalizados no HC-UFPR

e 493 (493/1.572 - 31,4%) eram de pacientes que participaram do programa de Vigilância epidemiológica do vírus Influenza na cidade de Curitiba.

Entre as amostras dos pacientes hospitalizados, 723 (723/1.079 - 67,0%) eram de pacientes internados nas unidades pediátricas (498 nas Unidades de Emergência Pediátrica e 225 na UTI pediátrica) e 356 (356/1.079 - 33,0%) amostras eram de pacientes hospitalizados ou atendidos nas unidades de TCTH. A mediana de idade dos pacientes internados nas unidades pediátricas foi de 2,0 meses (variando de 15 dias a 4 anos de idade) e a dos pacientes hospitalizados nas unidades de TCTH foi de 10,1 anos (variando de 1 mês a 59 anos de idade). A maioria dos pacientes 56,8% (613/1079) era do gênero masculino ($p=0,25$).

Entre as amostras dos pacientes ambulatoriais, 209 (209/493 - 42,4%) eram de pacientes que coletaram na UBS do Bairro Alto e 284 (284/493 - 57,6%) que coletaram na UBS do Salgado Filho. A idade mediana dos pacientes que apresentavam sintomas gripais foi de 8,3 anos (variando de 1 mês a 85 anos de idade). A maioria dos pacientes 62,8% (310/493) era do gênero feminino ($p=0,08$).

O estudo envolveu 445, 527 e 600 amostras de ANF que foram coletadas respectivamente nos anos de 2006, 2007 e 2008.

O diagnóstico laboratorial do hMPV foi realizado com a reação de RT-PCR padronizada para amplificar um segmento do gene N do hMPV. A análise foi realizada em todos os 1.572 ANF recebidos. O hMPV foi detectado em 61 (61/1.572 - 3,9%) amostras provenientes de 59 (59/1.222 - 4,8%) pacientes, sendo que a sua subtipagem (pelas técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento genético do gene F e N foi conseguida em 51 (51/61 - 83,6%) amostras. No período do estudo foram detectados hMPV dos subtipos A1, A2a, B1 e B2.

Casos de infecção respiratória pelo hMPV foram observados nas três unidades clínicas pesquisadas: unidades de pediatria (Serviço de Emergência e Unidade de Terapia Intensiva) e unidade de TCTH do HC-UFPR e em pacientes ambulatoriais atendidos nas UBS do Bairro Alto e do Salgado Filho. A Figura 30 mostra as diferentes unidades clínicas analisadas neste estudo, o número de amostras positivas para hMPV em cada uma delas e a respectiva faixa etária dos pacientes acometidos. A idade dos pacientes infectados pelo hMPV variou dependendo da unidade clínica investigada. O hMPV foi detectado em todas as faixas etárias, variando de 1 mês a 75 anos de idade, conforme demonstrado na Figura 31.

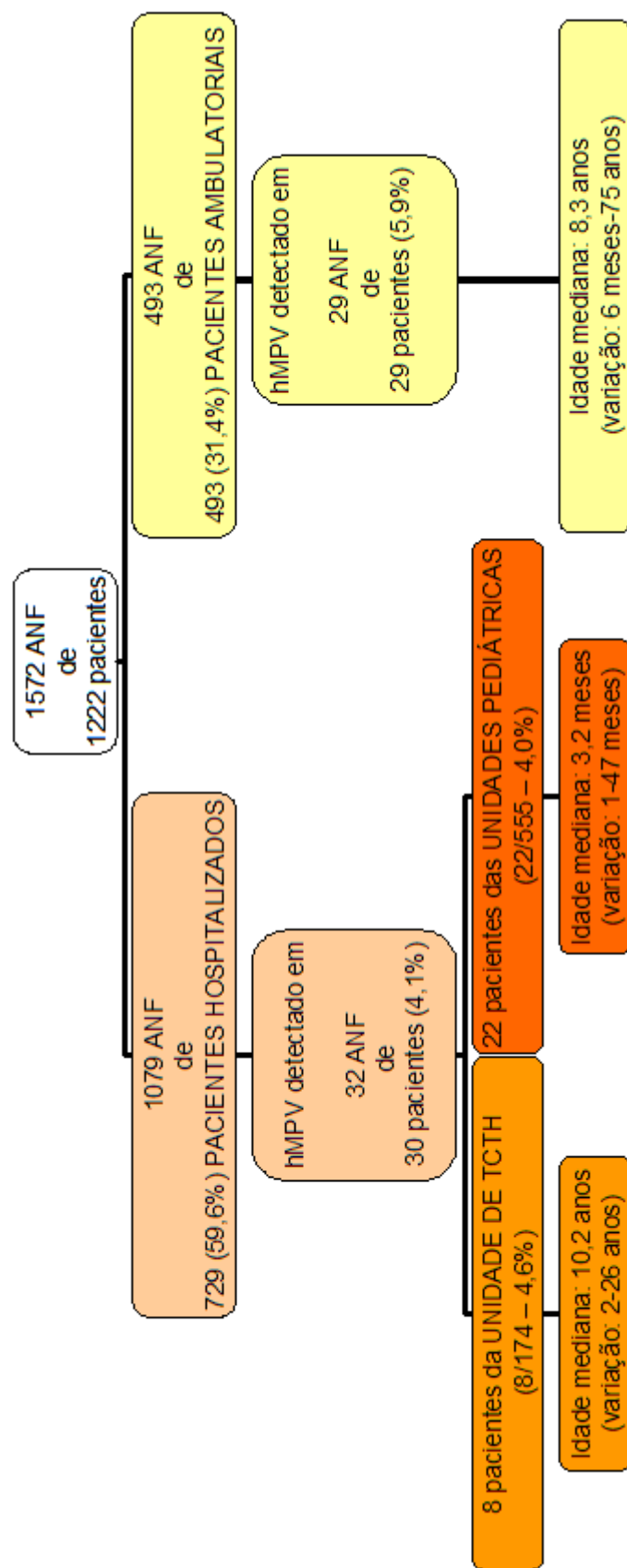


FIGURA 30: CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ANF RECEBIDAS ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR PARA INVESTIGAÇÃO DE VIRUS RESPIRATÓRIOS
FONTE: O autor (2010)

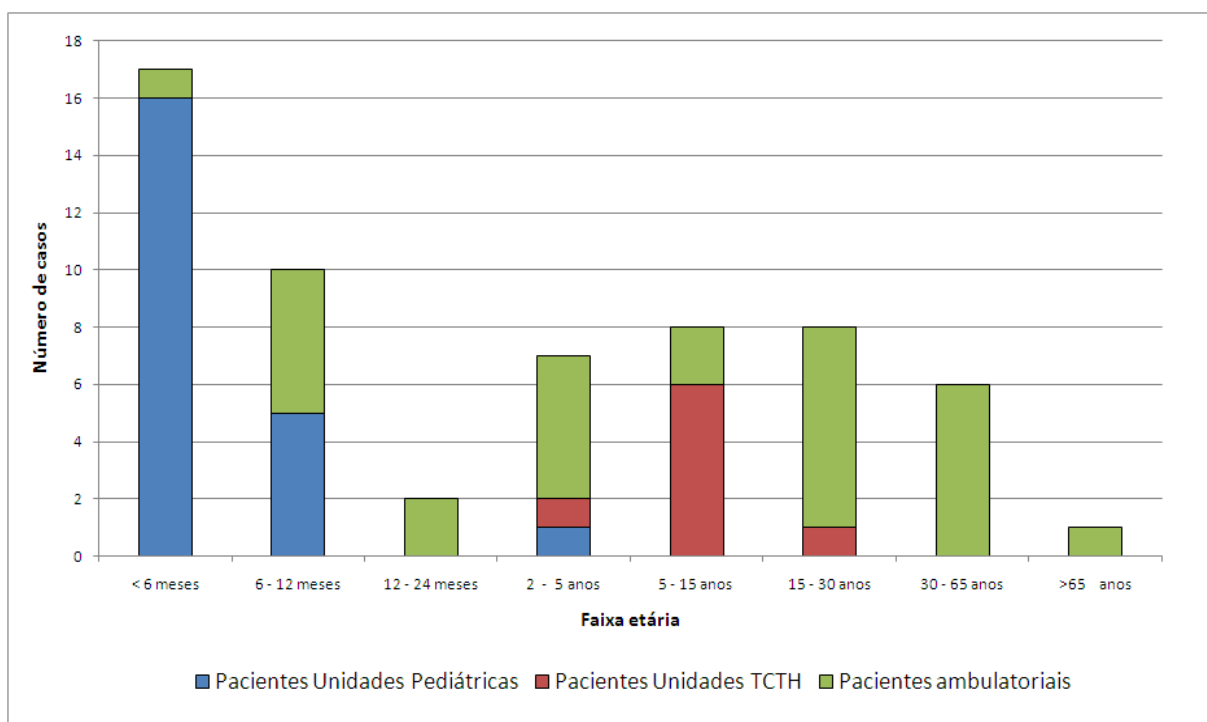


FIGURA 31 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES ACOMETIDOS PELA INFECÇÃO DO hMPV POR UNIDADE CLÍNICA INVESTIGADA

FONTE: O autor (2010)

O hMPV foi mais detectado em amostras de pacientes atendidos nos ambulatorios (29/493 – 5,9%) do que nos ANFs de pacientes que necessitaram de hospitalização (32/1079 – 3,0%) ($p=0,0072$), sendo encontrado principalmente em amostras de pacientes menores de 5 anos de idade (39/61 – 63,9%) ($p=0,0093$) e entre estes, os menores de 6 meses de idade. A maioria das amostras positivas (36/61 – 59,0%) era de pacientes do gênero feminino ($p=0,08$).

Conforme os dados demonstrados na Tabela 4, o hMPV foi detectado em 3,1% (14/445), 7,0% (37/527) e 1,7% (10/600) dos ANFs coletados respectivamente nos anos de 2006, 2007 e 2008. O ano de 2007 apresentou o maior número de amostras positivas para este vírus, no entanto, a maioria das amostras era de pacientes do Programa de Vigilância Epidemiológica do vírus Influenza (23/37 – 62,2%).

Outros vírus respiratórios foram pesquisados pelo laboratório de virologia do HC-UFPR nestas amostras de ANF, tendo sido detectado os vírus hRSV, FLUA, FLUB, AdV, PIV1, PIV2 e PIV3 em 25,3% (398/1.572) dos casos.

Casos de co-infecção entre hMPV e outros vírus respiratórios foram detectados em 16 (16/1.572 - 1%) amostras e ocorreram principalmente em crianças (12/16 – 75%) com a idade mediana de 5,4 meses (variando de 1 – 25 meses). Os vírus detectados nestes casos de co-infecção foram hRSV (7/16 – 43,7%), FLU A (4/16 – 25%), PIV3 (2/16 – 12,5%), AdV (2/16 – 12,5%) e FLU B (1/16 – 6,25%).

TABELA 4 - RESULTADOS DA DETECÇÃO DO hMPV NAS AMOSTRAS DE ANF COLETADAS NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2008, POR UNIDADES CLÍNICAS

Vírus	Pacientes Hospitalizados HC-JFPR					Pacientes Ambulatoriais (UBS Bairro Alto e Salgado Filho)					Total (n=1572)		
	Unidades de TCTH			Unidades Pediátricas									
	2006 (n=119)	2007 (n=127)	2008 (n=110)	Total (n=356)	2006 (n=208)	2007 (n=223)	2008 (n=292)	Total (n=723)	2006 (n=118)	2007 (n=177)		2008 (n=198)	Total (n=493)
hMPV	4(3,4%)	3(2,4%)	0(0,0%)	7(2,0%)	6(2,9%)	8(3,6%)	4(1,4%)	18(2,5%)	3(2,5%)	14(7,9%)	3(1,5%)	20(4,1%)	45(2,9%)
Co-infecção viral*	0(0%)	0(0%)	1 ^a (0,9%)	1(0,3%)	1 ^b (0,5%)	3 ^c (1,3%)	2 ^b (0,7%)	6(0,8%)	0(0%)	9 ^d (5,1%)	0(0%)	9(1,8%)	16(1,0%)
Outros vírus**	21(17,6%)	30(23,6%)	26(23,6%)	77(21,6%)	56(26,9%)	62(27,8%)	105(35,9%)	223(30,8%)	16(13,6%)	28(15,8%)	54(27,3%)	98(19,9%)	398(25,3%)
Negativo	94(79,0%)	94(74,0%)	83(75,5%)	271(76,1%)	145(69,7%)	150(67,3%)	181(62,0%)	476(65,8%)	99(83,9%)	126(71,2%)	141(71,2%)	366(74,2%)	1113(70,8%)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: *Casos de co-infecção viral foram determinados com o resultado da metodologia de imunofluorescência indireta para detecção de outros vírus respiratórios: ^a) hMPV/ PIV 3; ^b) hMPV/RSV; ^c) hMPV/RSV, hMPV/FLU B; hMPV/Adv ^d) hMPV/ PIV 3, hMPV/RSV, hMPV/Adv, hMPV/FLU A.

**Infecções por outros vírus respiratórios foram determinados usando a metodologia de IFI para investigação dos vírus respiratórios mais comuns em Curitiba. Os vírus pesquisados foram: hRSV, FLUA, FLUB, Adv, PIV1, PIV2 e PIV3.

6.4 CACTERÍSTICAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR hMPV

6.4.1 Pacientes hospitalizados no HC-UFPR com infecção por hMPV

6.4.1.1 Pacientes atendidos nas Unidades de Pediatria

Vinte e quatro (24/723 – 3,3%) amostras de 22 pacientes pediátricos hospitalizados no HC-UFPR foram positivas para hMPV. Dois pacientes coletaram amostras de ANF com menos de uma semana de intervalo. Nos três anos desta pesquisa foram internadas no HC-UFPR aproximadamente 5.820 crianças nas unidades de Pediatria (Serviço de Emergência, Enfermaria, Risco Intermediário, Unidade de Terapia Intensiva e Infectologia Pediátrica) e neste período o laboratório de virologia recebeu amostras de ANF de 555 pacientes. Assim sendo, a frequência de IRA por hMPV nas crianças hospitalizadas nas unidades de pediatria do HC-UFPR foi de 3,8/1.000 pacientes hospitalizados (22/5.820).

Na maioria dos casos de infecção pelo hMPV (16/22 – 72,7%), este vírus foi o único patógeno encontrado. Foram observados 6 (6/22 – 27,3%) casos de co-infecções com outros vírus respiratórios. Co-infecção por hRSV/hMPV foi encontrado em 4 (4/6 – 66,7%), FLUB/hMPV em 1 (1/6 – 16,7%) e AdV/hMPV em 1 (1/6 – 16,7%) casos de IRA, sendo diagnosticados quadros de bronquiolite e pneumonia nas co-infecções de hRSV/hMPV e traqueobronquite nos FLUB/hMPV e AdV/hMPV. Sepses bacterianas por *Staphylococcus aureus* foi diagnosticada em 3 (3/22 – 13,6%) pacientes.

A idade dos pacientes pediátricos infectados apenas pelo hMPV variou de 1 a 47 meses (mediana 3,2 meses), sendo mais observado em pacientes do sexo feminino (13/16 – 81,3%). Entre os pacientes co-infectados com outros vírus respiratórios a idade mediana de 4,0 meses (variando de 1 a 9,5 meses), sendo encontrados em 4 (4/6 – 66,7%) pacientes do sexo masculino (FIGURA 32). Apenas 14 (14/22 – 63,6%) crianças receberam aleitamento materno até os 6 meses de idade ou até o momento da infecção. Nos casos de co-infecção com outros vírus respiratórios, 5 (5/6 – 83,3%) crianças receberam aleitamento materno. Entre os

fatores de risco que poderiam contribuir para a infecção foram observados que uma (1/22 – 4,5%) criança era prematura, duas (2/22 – 9,1%) crianças apresentavam desnutrição moderada, três (3/22 – 13,6%) crianças eram tabagistas passivas e uma (1/22 – 4,5%) criança era portadora da Síndrome de Down.

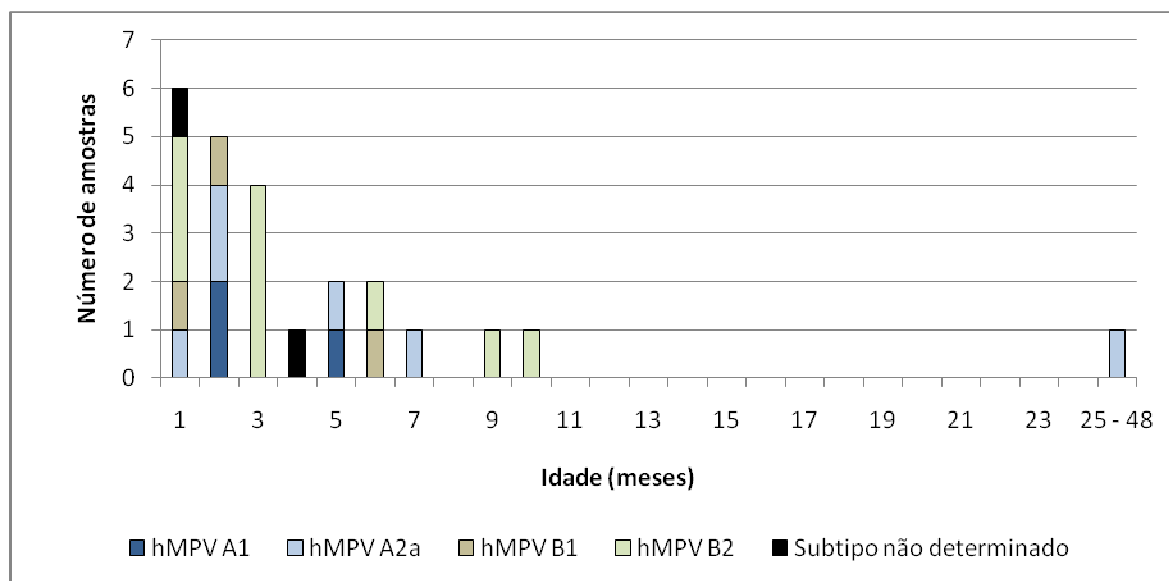


FIGURA 32 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS PELA INFECÇÃO DOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV
 FONTE: O autor (2010)

As manifestações clínicas da infecção pelo hMPV freqüentemente descritas nos prontuários dos pacientes pediátricos hospitalizados foram: dispnéia (20/22 – 90,9%), tosse (19/22 – 86,3%), taquipnéia (17/22 – 77,3%), febre (12/22 – 54,5%), respiração ruidosa (12/22 – 54,5%), cianose (11/22 – 50%), vômito (11/22 – 50%), apnéia (5/22 – 22,7%), coriza (4/22 – 18,2%) e diarreia (2/22 – 9,1%). Os valores médios da oximetria de pulso e do pCO₂ dos pacientes no momento da hospitalização foram 81,1 ± 11,6% e 39,6 ± 13,8 mmHg, respectivamente. Avaliações do RX de tórax mostraram infiltrados pulmonares bilaterais (1/7 – 14,3%), consolidações bilaterais ou no ápice (5/7 – 71,4%). Os diagnósticos finais mais freqüentes foram: bronquiolite (7/22 – 31,8%), broncopneumonia (4/22 – 18,2%), traqueobronquite (4/22 – 18,2%), laringotraqueobronquite (2/22 – 9,1%), pneumonia (2/22 – 9,1%) e insuficiência respiratória aguda (1/22 – 4,5%). Oxigenoterapia foi usada em 20 (20/22 – 90,9%) pacientes infectados por hMPV por uma média de 8,2

$\pm 6,6$ dias. Antibioticoterapia foi usada em 12 (12/22 – 54,5%) pacientes por uma média de $10,5 \pm 6,8$ dias. Inalação foi usada em 18 (18/22 – 81,8%) pacientes por uma média de $7,4 \pm 4,9$ dias. Broncodilatadores foram usados em 16 (16/22 – 72,7%) pacientes por uma média de $5,5 \pm 2,7$ dias. Corticóides foram prescritos em 8 (8/22 – 36,4%) pacientes por uma média de $5,0 \pm 3,8$ dias. Entre as crianças infectadas pelo hMPV 7 (7/22 – 31,8%) foram admitidas na Unidade de Terapia Intensiva e necessitaram de tratamento intensivo por uma média de 8 ± 1 dias. Ventilação mecânica foi necessária em 5 (5/22 – 22,7%) pacientes por uma média de $9,5 \pm 1,0$ dias. O tempo de hospitalização de todos os pacientes infectados variou de 2 a 84 dias (mediana 11 dias).

Em 19 pacientes pediátricos hospitalizados a informação da data do início dos sintomas estava relatada no prontuário médico e a coleta do ANF foi realizada em uma mediana de 5 dias (variando de 1 a 15 dias). Entre os pacientes que coletaram dentro do período de 5 dias do início dos sintomas, 4 (4/7 – 57,1%) foram hospitalizados na Unidade de Emergência e 3 (3/7 – 42,8%) necessitaram de cuidados intensivos. Os diagnósticos clínicos desses casos foram de bronquiolite (3/7 – 42,8%), broncopneumonia (1/7 – 14,3%), traqueobronquite (2/7 – 28,6%) e insuficiência respiratória aguda (1/7 – 14,3%). Entre os pacientes que coletaram amostras após o quinto dia do início dos sintomas, 8 (8/12 – 66,7%) foram hospitalizados na Unidade de Emergência e 4 (4/12 – 33,3%) necessitaram de cuidados intensivos. Os diagnósticos clínicos desses casos foram de broncopneumonia (3/12 – 25%), bronquiolite (3/12 – 25%), pneumonia (2/12 – 16,7%), traqueobronquite (2/12 – 16,7%), laringotraqueobronquite (1/12 – 8,3%). A Tabela 5 mostra as características clínicas, o tratamento e o diagnóstico final das infecções por subtipo de hMPV e casos de co-infecção com outros vírus respiratórios nos pacientes pediátricos hospitalizados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para estas características, bem como para o tratamento administrado e diagnóstico final das infecções pelos diferentes subtipos de hMPV e, da mesma forma, entre os casos de co-infecção com outros vírus respiratórios e infecção apenas pelo hMPV (TABELA 5).

Neste estudo, apenas um paciente foi a óbito devido complicações associadas à infecção pelo hMPV, sendo este do subtipo A2a. Era uma paciente do sexo feminino, com 5,1 meses de idade, portadora da Síndrome de Down e sua mãe era tabagista. A infecção pelo hMPV ocasionou um quadro de bronquiolite aguda,

seguido por infecção bacteriana secundária e após 23 dias de hospitalização a paciente foi a óbito por sepse. Todos os demais pacientes evoluíram para cura.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV NOS PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS NO HC-UFPR ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008

	Pacientes Pediátricos Hospitalizados (n= 21 [*])				
	A1 n= 2 (%)	A2a n= 4(%)	B1 n= 3(%)	B2 n= 7(%)	Co- infecções** n=5(%)
Feminino	2 (100)	3 (75)	2 (66,7)	4 (57,1)	2 (40)
Masculino	0	1 (25)	1 (33,3)	3 (42,8)	3 (60)
Idade (meses) Mediana (variação)	2(1,0 a 2,2)	6(2,2 a 47,5)	2(1,7 a 5,6)	3(1,0 a 10,0)	4(1,0 a 9,5)
Início dos sintomas antes da hospitalização Mediana dias(variação)	13(10 a 15)	5(1 a 10)	23(15 a 30)	4(1 a 15)	4(3 a 7)
Tempo de hospitalização Mediana dias(variação)	13(3 a 22)	17(7 a 84)	10(3 a 19)	15(4 a 26)	4(2 a 11)
Aleitamento materno	2 (100)	3 (75)	1 (33,3)	2 (25)	4 (80)
Manifestações Clínicas					
Dispneia	1 (50)	4 (100)	3 (100)	6 (85,7)	5 (100)
Respiração ruidosa	1 (50)	4 (100)	1 (33,3)	2 (28,6)	4 (80)
Tosse	2 (100)	3 (75)	2 (66,7)	6 (85,7)	5 (100)
Febre	0	3 (75)	2 (66,7)	3 (42,8)	4 (80)
Coriza	0	0	0	2 (28,6)	2 (40)
Apnéia	0	2 (50)	1 (33,3)	2 (28,6)	0
Cianose	1 (50)	2 (50)	1 (33,3)	4 (57,1)	3 (60)
Vômito	2 (100)	2 (50)	1 (33,3)	2 (28,6)	4 (80)
Taquipnéia	2 (100)	4 (100)	2 (66,7)	3 (42,8)	5 (100)
Diarréia	0	0	0	1 (14,3)	1 (20)
Exames Complementares					
Oximetria de pulso (média % ± desvio padrão)	***	82,2 ± 7,7	91,3 ± 4,2	76,1 ± 12,9	83,8 ± 5,9
pCO ₂ (média mmHg ± desvio padrão)	36,9	34,9 ± 6,5	40,7	35,5 ± 7,1	34,6 ± 4,9
Frequência Cardíaca (média bmp ± desvio padrão)	170 ± 56	161 ± 38	135 ± 7	190 ± 33	150 ± 13
Frequência Respiratória (média mpm ± desvio padrão)	73 ± 9	68 ± 10	68 ± 15	60 ± 16	66 ± 9

Continua

					Conclusão
	A1 n= 2 (%)	A2a n= 4(%)	B1 n= 3(%)	B2 n= 7(%)	Co- infecções** n=5(%)
Diagnóstico					
Insuficiência Respiratória	0	1 (25)	0	0	0
Bronquiolite	0	2 (50)	2 (66,7)	0	2 (40)
Pneumonia	0		0	0	1 (20)
Laringotraqueobronquite	1 (50)	0	0	1 (12,5)	0
Broncopneumonia	0	1 (25)	0	4 (57,1)	0
Traqueobronquite	0	0	1 (33,3)	1 (12,5)	2 (40)
Nenhum diagnóstico	1 (50)	0	0	0	0
Tratamento					
Inalação	2 (100)	4 (100)	3 (100)	5 (71,4)	3 (60)
Tempo (média dias \pm desvio padrão)	3 \pm 0	8,5 \pm 2,1	14,5 \pm 6,3	7,0 \pm 4,2	6,0 \pm 2,8
Broncodilatadores	1 (50)	2 (50)	3 (100)	6 (85,7)	3 (60)
Tempo (média dias \pm desvio padrão)	3 \pm 0	8,5 \pm 2,1	6,5 \pm 4,9	4,3 \pm 0,6	5,3 \pm 2,3
Corticóides	1 (50)	2 (50)	1 (33,3)	4 (57,1)	0
Tempo (média dias \pm desvio padrão)	1 \pm 0	7,5 \pm 0,7	10	2,0 \pm 0,0	
Oxigenoterapia	2 (100)	3 (75)	3 (100)	6 (85,7)	4 (80)
Tempo (média dias \pm desvio padrão)	12,0 \pm 14,0	9,5 \pm 0,7	6,0 \pm 4,2	5,4 \pm 3,8	5,4 \pm 2,9
Ventilação Mecânica	1 (50)	2 (50)	0	2 (28,6)	0
Tempo (média dias \pm desvio padrão)	10	8 \pm 0		10 \pm 0	
Admissão a UTI	1 (50)	2 (50)	1 (33,3)	2 (28,6)	1 (20)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

* Apenas foram considerados os casos de hMPV subtipados.

** Co-infecções com outros vírus respiratórios: hRSV/hMPV, FLUB/hMPV, AdV/hMPV.

*** Dados não disponíveis no prontuário médico.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos dados analisados ($p > 0,05$).

6.4.1.2 Pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

Oito (8/356 – 2,2%) amostras de 8 pacientes submetidos à TCTH foram positivas para hMPV. Nos três anos desta pesquisa o HC-UFPR realizou 248 transplantes de células tronco hematopoiéticas e neste período o laboratório de virologia recebeu amostras de ANF de 174 pacientes. Assim sendo, a frequência de IRA por hMPV nos pacientes submetidos à TCTH no HC-UFPR foi de 3,2/100 pacientes transplantados (8/248).

Na maioria dos casos de infecção pelo hMPV (7/8 – 87,5%), este vírus foi o único patógeno encontrado. Apenas 1 (1/8 – 12,5%) caso de co-infecção com PIV 3 foi observado. Este paciente teve comprometimento do trato respiratório inferior, desenvolvendo pneumonia.

A idade mediana dos pacientes imunocomprometidos infectados pelo hMPV foi de 10,2 anos (variando de 2-26 anos de idade) (FIGURA 33), sendo encontrado em 5 (5/8 – 62,5%) pacientes do sexo feminino. Entre os pacientes infectados, 1 (1/8 – 12,5%) teve a infecção antes do transplante e 7 (7/8 – 87,5%) após o transplante.

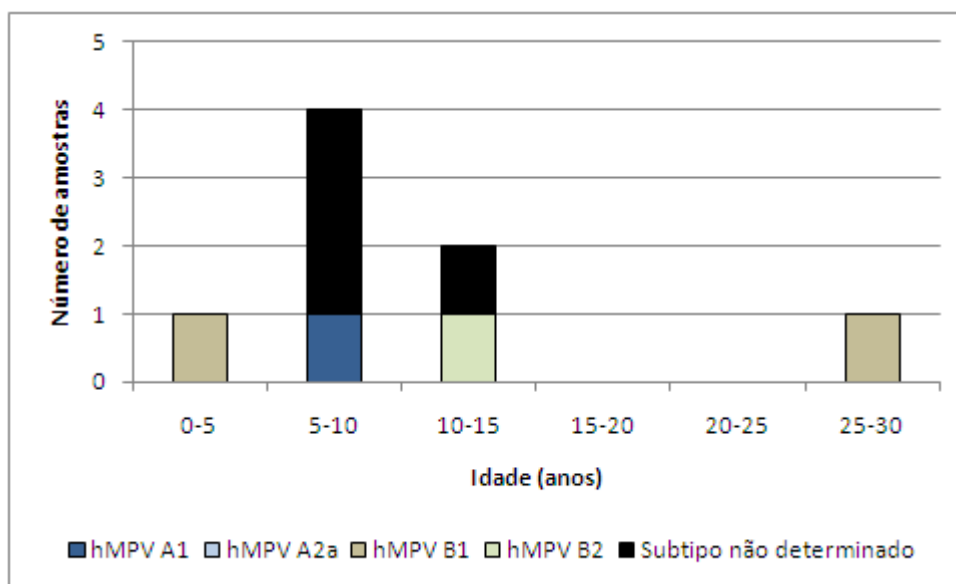


FIGURA 33 - Faixa etária dos pacientes submetidos à TCTH infectados pelos diferentes subtipos de hMPV

FONTE: O autor (2010)

O paciente que foi infectado pelo hMPV antes do transplante, teve a infecção 14 dias antes do procedimento. O paciente tinha 9 anos de idade e leucemia linfocítica aguda, como doença de base. As manifestações clínicas relatadas foram: febre, tosse, coriza, cefaléia, otalgia e anorexia. O paciente foi tratado com sintomáticos.

A idade mediana dos pacientes que tiveram a infecção pelo hMPV após a data do transplante foi de 11,8 anos (variando, 2 – 26). Todos os pacientes tiveram a infecção nos primeiros 100 dias após o transplante. A doença de base destes pacientes era de anemia aplástica severa, leucemia mielóide crônica, leucemia

linfocítica aguda, linfoma não-Hodking e síndrome de Wiskott-Aldrich. Embora o presente estudo tenha incluído pacientes submetidos a transplante autólogo e alogênico, a infecção pelo hMPV foi observada somente em pacientes submetidos a transplante alogênico. Cinco (5/7 – 71,4%) pacientes tiveram doadores aparentados de células hematopoiéticas, enquanto 2 (2/7 – 28,6%) pacientes tiveram doadores não aparentados. As manifestações clínicas frequentemente descritas foram: tosse (7/7 – 100%), febre (5/7 – 71,4%), coriza (5/7 – 71,4%), otalgia (2/7 – 28,6%) e dispnéia (2/7 – 28,6%). A maioria dos pacientes (6/8 - 75%) apresentou apenas infecção no trato respiratório superior. Dois (2/8 - 25%) pacientes tiveram complicação no trato respiratório inferior com infiltrado intersticial, conforme observado na avaliação radiológica, sendo que estes pacientes tiveram doadores de células troncos não aparentados.

Para os pacientes que tiveram a infecção por hMPV apenas no trato respiratório superior foram prescritos medicamentos para os sintomas e o tratamento foi realizado em casa. Os pacientes de 3 e 10 anos de idade que desenvolveram quadros de pneumonia foram hospitalizados por 1 e 35 dias, respectivamente. Estes foram tratados com oxigenoterapia, esteróides, antibióticos e broncodilatadores, sendo que o paciente de 10 anos necessitou de ventilação assistida por 20 dias. Nenhum paciente evoluiu para o óbito. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os distintos subtipos de hMPV detectados nesta população e manifestação clínica, tratamento administrado e diagnóstico final da infecção.

6.4.2 Pacientes ambulatoriais com infecção por hMPV

Vinte e nove (29/493 – 5,9%) amostras de 29 pacientes atendidos nas UBS do Bairro Alto e Salgado Filho - participantes do Programa de Vigilância Epidemiológica do vírus influenza - foram positivas para hMPV. Nos três anos desta pesquisa estas unidades de saúde atenderam 13.443 casos de síndromes gripais, sendo que o laboratório de virologia apenas recebeu amostras de 493 pacientes, portanto a frequência de IRA por hMPV nesta população foi de 2,16/1.000 pacientes com síndrome gripal (29/13.443).

Na maioria dos casos de infecção pelo hMPV (20/29 – 68,9%), este vírus foi o único patógeno encontrado. Foram observados 9 (9/29 – 31,0%) casos de co-infecções com outros vírus respiratórios. Co-infecção por FLUA/hMPV foi encontrado em 4 (4/9 – 44,4%), hRSV/hMPV em 3 (3/9 – 33,3%), AdV/hMPV em 1 (1/9 – 11,1%) e PIV3/hMPV em 1 (1/9 – 11,1%) casos de IRA, sendo diagnosticados quadros de sinusite nos hRSV/hMPV e laringofaringite aguda nos AdV/hMPV.

A idade dos pacientes atendidos nos ambulatorios infectados apenas pelo hMPV variou de 1 a 75 anos (mediana 8,3 anos) (FIGURA 34), sendo mais observado em pacientes do sexo masculino (11/20 – 55,5%). Entre os pacientes co-infectados com outros vírus respiratórios a idade variou de 1 a 40 anos (mediana 1 ano), sendo encontrados em 8 (8/9 – 88,9%) pacientes do sexo feminino.

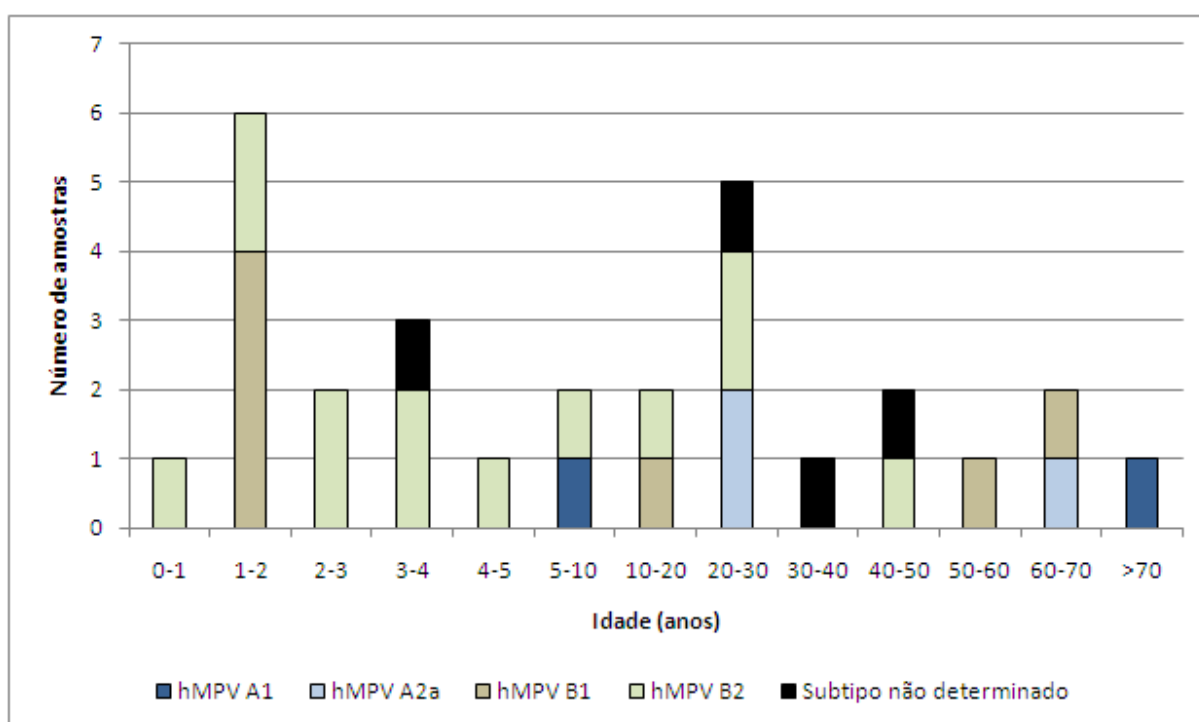


FIGURA 34 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES AMBULATORIAIS INFECTADOS PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV

FONTE: O autor (2010)

Os pacientes infectados pelo hMPV e atendidos nas UBS apresentaram as seguintes manifestações clínicas: coriza (24/29 – 82,8%), tosse (23/29 – 79,3%), febre (22/29 – 75,9%), dispnéia (19/29 – 65,5%), dor de cabeça (14/29 – 48,3%), mialgia (13/29 – 44,8%), faringite (11/29 – 37,9%) e otalgia (6/29 – 20,7%). Apenas

11 (11/29 – 37,9%) casos de infecção por hMPV relacionados a um diagnóstico final do quadro respiratório foram descritos nos prontuários médicos, e os mais freqüentes foram: sinusite (5/11 – 45,5%), nasofaringite (4/11 – 36,4%), bronquite (1/11 – 9,1%) e laringofaringite (1/11 – 9,1%). Antibioticoterapia foi usada em 9 (9/29 – 31,0%) pacientes por uma média de $9,0 \pm 1,5$ dias. Broncodilatadores foram usados em 2 (2/29 – 6,9%) pacientes por uma média de $4,0 \pm 1,4$ dias. Corticóides não foram usados.

As tabelas abaixo mostram as características demográficas, clínicas, diagnóstico final e tratamento das IRAs em pacientes ambulatoriais, em relação a cada subtipo de hMPV detectado e co-infecção viral (TABELA 6) e em relação a faixa etária dos pacientes acometidos (TABELA 7). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para estas características, bem como para o tratamento administrado e diagnóstico final das infecções pelos diferentes subtipos de hMPV e também entre os casos de co-infecção com outros vírus respiratórios e infecção apenas pelo hMPV.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE hMPV NOS PACIENTES AMBULATORIAIS DA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008

	Subtipos detectados de hMPV (n= 25)				
	A1 n= 2(%)	A2a n= 3(%)	B1 n= 3(%)	B2 n= 9(%)	Co-infecções n=8*(%)
Feminino	1 (50)	1 (33,3)	3 (100)	3 (33,3)	7 (87,5)
Masculino	1 (50)	2 (66,7)	0	6 (66,7)	1 (12,5)
Idade (anos) Mediana (variação)	41,9 (8 – 75)	26,6 (25 – 62)	59,5 (54 – 64)	4 (1 - 29)	1,0 (1 – 40)
Sintomas					
Dispnéia	1 (50)	3 (100)	2 (66,7)	7 (77,8)	2 (25,0)
Respiração ruidosa	0	0	0	1 (11,1)	0
Tosse	2 (100)	3 (100)	1 (33,3)	9 (100)	3 (37,5)
Febre	2 (100)	3 (100)	3 (100)	9 (100)	8 (100)
Coriza	2 (100)	3 (100)	2 (66,7)	9 (100)	3 (37,5)
Vômito	0	0	0	1 (11,1)	0
Cefaléia	1 (50)	3 (100)	2 (66,7)	3 (33,3)	2 (25)
Mialgia	0	3 (100)	2 (66,7)	3 (33,3)	3 (37,5)
Faringite	1 (50)	2 (66,7)	0	4 (44,4)	2 (25)
Otalgia	0	1 (33,3)	0	3 (33,3)	1 (12,5)
Diagnóstico					
Nasofaringite	1 (50)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (11,1)	0
Laringofaringite	0	0	0	0	1 (12,5)
Bronquite	0	0	0	1 (11,1)	0
Sinusite	0	0	0	2 (22,2)	1 (12,5)
Nenhum diagnóstico	1 (50)	2 (66,7)	2 (66,7)	5 (55,6)	6 (75)
Tratamento					
Antibioticoterapia	0	0	0	3 (33,3)	1 (12,5)
Tempo				10 dias	7 dias
Inalação	0	0	0	2 (22,2)	0
Tempo				5 dias	
Broncodilatadores	0	0	0	1 (11,1)	0
Tempo				5 dias	
Antiinflamatório	1 (50)	2 (66,7)	0	4 (44,4)	2 (25)
Tempo	5 dias	5 dias		5 dias	5 dias
Analgésico/Antitérmico	2(100)	3 (100)	3(100)	9 (100)	7(100)
Tempo	**	**	**	**	**
Anti-histamínico	0	0	0	1 (11,1)	1 (12,5)
Tempo				7 dias	7 dias

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

*Co-infecções com outros vírus respiratórios: FLUA/hMPV, hRSV/hMPV, AdV/hMPV e PIV3/hMPV.

** Prescrito administração apenas em casos de febre.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos dados analisados ($p>0,05$).

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO hMPV EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DOS PACIENTES AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008

	Faixas Etárias dos pacientes ambulatoriais infectados pelo hMPV (n=29)		
	< 5 anos n=13 (%)	5 – 40 n=10 (%)	>40 n=6 (%)
Feminino	6 (46,2)	6 (60)	5 (83,3)
Masculino	7 (53,8)	4 (40)	1 (16,7)
Idade (anos) Mediana (variação)	2,7 (1 – 4)	20,9 (7 – 34)	56,8 (40 – 75)
Sintomas			
Dispneia	6 (46,2)	9 (90)	5 (83,3)
Respiração ruidosa	2 (15,4)	0	0
Tosse	13 (100)	10 (100)	6 (100)
Febre	13 (100)	10 (100)	5 (83,3)
Coriza	13 (100)	10 (100)	6 (100)
Vômito	1 (7,7)	0	0
Cefaléia	1 (7,7)	9 (90)	5 (83,3)
Mialgia	0	8 (80)	5 (83,3)
Faringite	2 (15,4)	5 (50)	4 (66,7)
Otalgia	0	4 (40)	2 (33,3)
Diagnóstico			
Nasofaringite	1 (7,7)	2 (20)	1 (16,7)
Laringofaringite	0	0	1 (16,7)
Bronquite	1 (7,7)	0	0
Sinusite	2 (15,4)	1 (10)	0
Nenhum diagnóstico	9 (69,2)	7 (70)	4 (66,7)
Tratamento			
Antibioticoterapia	3 (23,1)	3 (30)	2 (33,3)
Tempo	10 dias	10 dias	7 dias
Inalação	3 (23,1)	1 (10)	0
Tempo	5 dias	5 dias	
Broncodilatadores	2 (15,4)	0	0
Tempo	5 dias		
Antiinflamatório	3 (23,1)	8 (80)	4 (66,7)
Tempo	5 dias	5 dias	5 dias
Analgésico/Antitérmico	13 (100)	10 (100)	6 (100)
Tempo	*	*	*
Anti-histamínico	1 (7,7)	1 (10)	0
Tempo	7 dias	7 dias	

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

* Prescrito administração apenas em casos de febre.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos dados analisados ($p>0,05$).

6.5 SAZONALIDADE DO hMPV

O hMPV foi detectado em amostras coletadas entre os meses de janeiro a novembro. Observou-se que há dois períodos de maior frequência do vírus durante o ano: um no outono e outro no inverno e início da primavera. Geralmente, a presença do hMPV está associada com a diminuição da temperatura e com o aumento da pluviosidade. A Figura 35 mostra a distribuição do hMPV nos três anos do estudo e a sua relação com a temperatura média mensal (°C) e pluviosidade média mensal (cm).

A maior incidência do hMPV (18/37 – 48,6%) ocorreu nos meses de maio e junho de 2007. Todos os genótipos (A e B) do hMPV foram detectados nestes três anos de estudo, tanto nos pacientes ambulatoriais, quanto nos pacientes hospitalizados. Em 2006 e 2007 dois subtipos de hMPV co-circularam no ano, sendo detectados os subtipos A1/B2 e B1/B2, respectivamente. Em 2008 apenas um subtipo de hMPV foi detectado (A2a). O subtipo B2 teve maior frequência no período de estudo (24/51 – 47,0%), sendo detectado em dois anos seguidos.

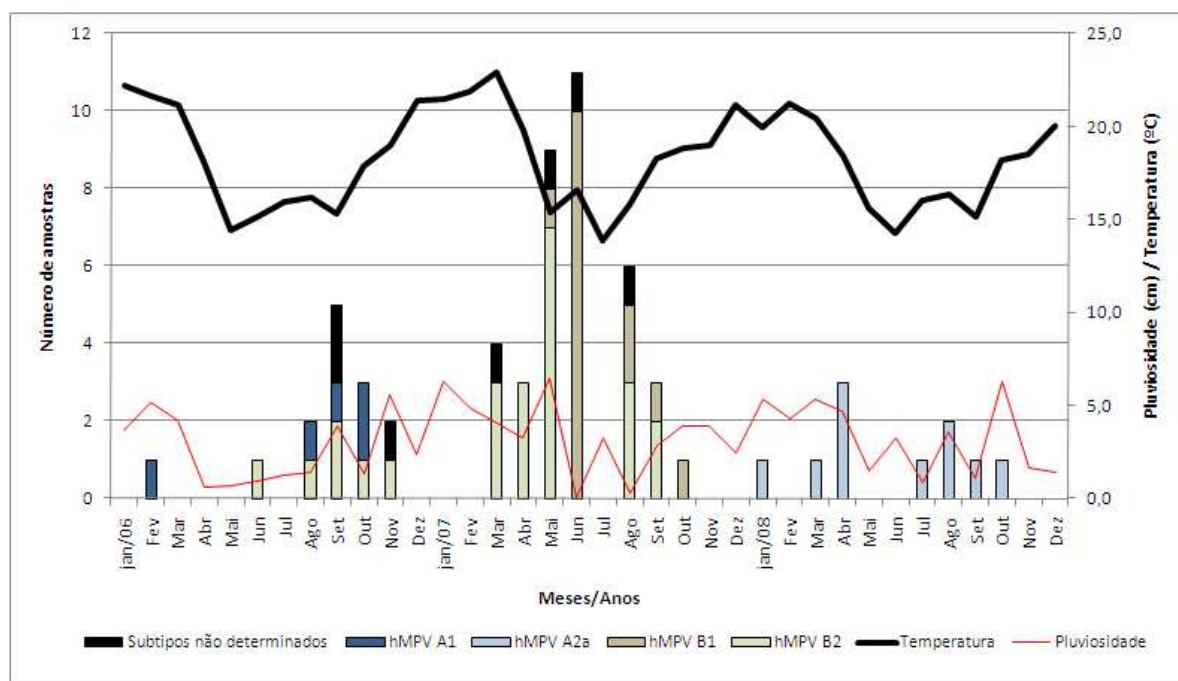


FIGURA 35: SAZONALIDADE DO hMPV ENTRE OS ANOS DE 2006 A 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR.
FONTE: O autor (2010)

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial do hMPV foi realizado pela técnica de RT-PCR, que é um teste relativamente rápido e sensível para uma rotina laboratorial, sendo considerado o melhor método para o diagnóstico deste vírus. Côtê *et al.* (2003) compararam a eficiência de amplificação de diferentes genes do hMPV por PCR em tempo real (*Light Cycler*®, Roche) e chegaram a conclusão de que os genes da nucleoproteína (N) e polimerase (L) viral, por se tratar de genes conservados, são os mais indicados para o diagnóstico laboratorial. Mirazo *et al.* (2005) posteriormente utilizaram o protocolo descrito por Côtê *et al.* (2003) para amplificação do gene N em uma plataforma de PCR convencional. Neste estudo optou-se por padronizar a metodologia descrita por Mirazo *et al.* (2005) realizando algumas modificações para melhorar a eficiência da técnica, como: aumento no tempo da extensão na reação PCR para 1 minuto e diminuição na concentração dos iniciadores para 5 pmol/μL. Estas alterações mostraram-se eficientes na detecção do gene N do hMPV em 61 amostras de ANF. Uma vez que os genótipos A (subtipos A1 e A2a) e B (subtipos B1 e B2) foram detectados pelo seqüenciamento genético é possível concluir que o protocolo descrito é capaz de amplificar amostras de ambos os genótipos (SARASINI *et al.*, 2006).

Os ensaios de amplificação do controle positivo definiram o limite de detecção da reação de PCR em 180 cópias/reação. Kuypers *et al.* (2005) demonstraram que metodologias de PCR em tempo real apresentam um limite inferior de detecção, chegando a 10 cópias/reação. Côtê *et al.* (2003) utilizando os mesmos iniciadores que este estudo, porém com a metodologia de PCR em tempo real com detecção pelo *SYBR GREEN* no equipamento *Light Cycler*® (Roche) estimaram a sensibilidade do ensaio para 100 cópias/reação. Tais achados sugerem que a metodologia padronizada por PCR convencional apresentou uma boa sensibilidade.

O controle interno (PRV) usado neste protocolo foi importante para prevenir resultados falso negativos, que poderiam surgir devido a uma ineficiente extração do RNA ou a presença de inibidores da reação de PCR na amostra em questão. A verificação de uma possível inibição da reação de PCR pela quantidade de cópias do controle interno inseridos no tampão de extração foi necessário, devido tanto a

amplificação do PRV quanto a do hMPV ocorrerem no mesmo tubo e competirem pelos reagentes da reação de PCR, como: enzima e dNTPs. A quantidade de 500 cópias do PRV adicionado no tampão de extração não influenciou na sensibilidade da reação de PCR em detectar 180 cópias/reação do gene N do hMPV. Cada rotina de extração e amplificação das amostras de ANF foi analisada juntamente com um controle negativo, que validou a ausência de uma possível contaminação durante o processamento da amostra e um controle positivo que validou as condições da reação de PCR. O controle positivo produzido utilizado na diluição determinada mostrou-se eficiente, porém recomenda-se que alíquotas deste controle sejam realizadas para uso rotineiro, evitando o congelamento e descongelamento sucessivos.

Finalmente, a metodologia de RT-PCR para detecção do gene N mostrou-se sensível, específica (não apresentou reação cruzada com outros vírus respiratórios habitualmente circulantes em Curitiba), rápida e de fácil realização para diagnóstico laboratorial de rotina do hMPV.

Um dos objetivos do estudo era isolar o hMPV em cultivo celular com o intuito de ampliar a carga viral, permitindo assim a realização do seqüenciamento genético do vírus para determinação dos subtipos circulantes, correlacionando genótipo/subtipo com gravidade de infecção. No entanto, não se obteve sucesso no isolamento viral. Um dos motivos do hMPV ter sido descrito tão tardiamente é a dificuldade de isolá-lo em cultivo celular (DEFFRASNES *et al.*, 2005). O hMPV replica lentamente em poucas linhagens celulares (BOIVIN *et al.*, 2002; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001), sendo que as linhagens LLC-MK2 e HEp-2 se mostraram mais eficientes para o isolamento do hMPV (BAO *et al.*, 2007; BIACCHESSI *et al.*, 2004; LANDRY *et al.*, 2005; REINA *et al.*, 2007). Neste trabalho tentou-se o isolamento do vírus tanto pelo método convencional quanto pelo método de centrifugação rápida (*Shell Vial*) em linhagens de LLC-MK2 e HEp-2. O efeito citopático normalmente é observado após um tempo médio de incubação de 17,3 dias (variando de 2-23 dias) (BOIVIN *et al.*, 2002), desta maneira, a incubação foi acompanhada por até 30 dias após a inoculação, pois Chan *et al.* (2003) relataram que prolongando o tempo de incubação para 20-28 dias aumentariam as chances de isolar o hMPV, mas mesmo assim não se conseguiu o isolamento.

O isolamento viral é uma técnica laboriosa e vários fatores podem ter influenciado nesta metodologia. Um dos pré-requisitos para o isolamento viral é que

o vírus precisa estar infectante, a partícula viral precisa estar completa e a célula hospedeira susceptível ao vírus, ou seja, apresentar os receptores necessários para a interação com o vírion e conseqüente entrada na célula. Desta maneira, uma condição ideal para garantir a infectividade do vírus seria o envio da amostra, sob refrigeração, imediatamente após a coleta ao laboratório, evitando-se a desnaturação das proteínas de superfície viral e inoculá-la nas linhagens susceptíveis no momento do processamento da mesma, impedindo o congelamento e descongelamento sucessivos. No entanto, as amostras do presente estudo, coletadas no período de 2006 a 2008 e mantidas congeladas a -80°C foram inoculadas somente no final do ano de 2008, sendo que durante este período houve alguns episódios de descongelamento do freezer. Outros fatores seriam a carga viral infectiva presente na amostra e para tanto a coleta deveria ter sido realizada o mais precoce na fase aguda da doença, além de ser transportada rapidamente e de forma adequada.

Deste modo, a subtipagem do vírus por meio do seqüenciamento genético foi realizado diretamente da amostra clínica. Este tipo de seqüenciamento apresenta a vantagem de demonstrar a seqüência real do genoma do vírus infectante humano, pois evita mudanças aminoacídicas devido à adaptação das proteínas da superfície viral às células da cultura celular (KÖNIG *et al.*, 2004; LUDEWICK *et al.*, 2005). Para a subtipagem do vírus, decidiu-se seqüenciar um fragmento do gene F, pois Boivin *et al.* (2004) demonstraram que este gene, por dar origem a uma proteína de superfície e pelo fato de apresentar uma porção altamente conservada, pode ser usado como referência em estudos de variabilidade genética e genotipagem viral. Adicionalmente, decidiu-se seqüenciar também o fragmento do gene N e assim obteve-se outro gene para subtipar as amostras, bem como comparar os resultados da subtipagem entre esses dois genes.

O seqüenciamento genético foi obtido em 51 das 61 amostras positivas para hMPV, sendo que em 3 amostras conseguiu-se seqüenciar tanto o fragmento do gene N quanto o do gene F. Somente em amostras com concentrações de DNA superior a 3 ng/μL alcançou-se um seqüenciamento nucleotídico com resolução, portanto o não isolamento do vírus foi um fator limitante para a realização dos estudos genéticos. A metodologia de purificação do produto de PCR provavelmente não influenciou na quantidade de DNA recuperada, uma vez que o método de recorte da banda no gel, que resultou em uma pequena concentração de DNA final,

apenas foi usado quando havia bandas inespecíficas na reação, ou seja, possivelmente a amostra apresentava interferentes que influenciou na reação de PCR e conseqüente menor amplificação do fragmento alvo.

A árvore filogenética foi construída com uma região em comum de todas as seqüências obtidas e desta maneira a árvore para o gene F foi construída com 220 nucleotídeos e a do gene N com 156 nucleotídeos. Estudos prévios demonstraram que os padrões filogenéticos produzidos por um fragmento destes genes são semelhantes aos produzidos pelo seqüenciamento completo do gene (CHUNG *et al.*, 2008; HUCK *et al.*, 2006; LUDEWICK *et al.*, 2005; MACKAY *et al.*, 2004).

De um modo geral, a subtipagem do hMPV é realizada pela análise nucleotídica, pois poucas diferenças aminoacídicas discriminam os genótipos A e B, e variações polimórficas tendem a agrupar discretamente os subtipos (YANG *et al.*, 2009).

A análise da árvore filogenética construída com as seqüências nucleotídicas parciais dos genes N e F mostraram a presença de 2 grupos principais (A e B) que podem ser subdivididos em 2 subgrupos (1 e 2) (HUCK *et al.*, 2006; ISHIGURO *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009). O alto valor do *bootstrap* suportou esta divisão entre os genótipos A e B (90 - 100%) e subtipos A1, A2a, A2b, B1 e B2 (76-98%), embora neste estudo, o subtipo A2b não tenha sido detectado. Entretanto, a topologia da árvore com seqüências parciais do gene F para o subtipo A1 foi suportada apenas com 55% das réplicas de *bootstrap*. Van den Hoogen *et al.* (2004a) e Yang *et al.* (2009) realizaram estudos filogenéticos com seqüências parciais e completas do gene F obtidas em um período de 20 anos, respectivamente, e tanto o valor do *bootstrap* quanto a topologia da árvore foram semelhantes com a obtida neste estudo. Adicionalmente, os subtipos detectados pelo seqüenciamento do gene F foram suportados também pela análise de identidade/similaridade entre as seqüências obtidas e as seqüências referências.

A composição nucleotídica das seqüências obtidas para o genes F e N revelaram 82,8-87,1% e 81,7-84,9% de similaridade entre os genótipos A e B dos hMPV detectados e uma identidade de 94,8–97,2% e 95,4% entre os subtipos do genótipo A e 92,9-97,2% e 92,6% entre os subtipos do genótipo B, respectivamente. Deste modo, as seqüências mostraram maior diversidade nucleotídica e aminoacídica entre os genótipos A e B (MACKAY *et al.*, 2004; GAUNT *et al.*, 2009). Huck *et al.* (2006) analisaram seqüências parciais do gene F do hMPV (506

nucleotídeos) e determinaram que a identidade nucleotídica entre os genótipos A e B foi de 84-87% enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 92-94% e 94-96%, respectivamente. Bastien *et al.* (2003) analisaram as seqüências ORF do gene N e determinaram que a identidade nucleotídica entre os genótipos A e B foi de 85-86% enquanto que entre os subtipos foi de 93-100%. As seqüências obtidas neste estudo apresentaram uma percentagem de similaridade maior comparado aos estudos de Huck *et al.* (2006) e Bastien *et al.* (2003), possivelmente por ter sido comparado um fragmento menor dos genes (220 nt para o gene F e 156 nt para o gene N) (LUDEWICK *et al.*, 2005; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004a). Embora um pequeno número de amostras tenha sido seqüenciado para o gene N, a análise das seqüências aminoacídicas do mesmo mostrou pouca variabilidade. Dados da literatura mostram que os genes mais conservados são aqueles que correspondem a regiões mais internas do vírus (gene N) e os genes mais variáveis são aqueles que correspondem a regiões externas do vírus (genes G e F) (GALIANO *et al.*, 2006).

Entre as amostras do subtipo B2 que circularam nos anos de 2006 e 2007 observou-se que pequenas substituições nucleotídicas ocorreram no gene F, o que coloca estas amostras em ramos separados na análise da árvore filogenética, porém o baixo valor das réplicas de *bootstrap* (<70%) não confirmam a topologia da árvore, indicando que estas amostras não sugerem um novo subtipo de hMPV, mas apenas polimorfismos (HUCK *et al.*, 2006; LUDEWICK *et al.*, 2005). A variação genética é um forte indicador da evolução viral e a habilidade do subtipo viral permanecer em uma determinada população (LUDEWICK *et al.*, 2005). Estima-se que as mutações no gene F ocorram em $7,12 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano (YANG *et al.*, 2009).

Análises filogenéticas com amostras de diferentes países em diferentes anos, mostram que todos os subtipos do hMPV distribuem-se de forma randomizada, sugerindo a circulação de uma população de hMPV relativamente homogênea no mundo (BASTIEN *et al.*, 2003; BOIVIN *et al.*, 2002; ESPER *et al.*, 2003; PERET *et al.*, 2004; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004a). Comparando as seqüências deste estudo com as seqüências referências selecionadas, que são provenientes de cepas isoladas em outros países em diferentes anos (Estados Unidos: 1985, 1986, 1992, 2000; Canadá: 1997, 1998, 1999, 2000; Holanda: 2000, 1999 e Japão 2003), observa-se que a população de hMPV detectada em Curitiba (PR) entre os anos de 2006 e 2008 é muito semelhante à circulante em outros países (BASTIEN *et al.*, 2003).

A vantagem de se realizar um seqüenciamento genético de um vírus é a possibilidade de poder compará-lo com outras seqüências já descritas e avaliar a variabilidade genética. Deste modo, o uso desta ferramenta apenas para a subtipagem viral se torna uma técnica de alto custo e, portanto não é indicada para um diagnóstico laboratorial de rotina. Diante do exposto, decidiu-se realizar a metodologia de PCR seguido da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) tendo o gene F como alvo para a subtipagem do vírus, conforme descrito por Montes *et al.*, (2008).

A técnica de PCR-RFLP realizada conseguiu subtipar 5 (8,2%) amostras, sendo que a digestão apenas mostrou-se eficiente nas amostras que apresentavam uma banda de maior intensidade na reação de PCR. No protocolo descrito por Montes *et al.* (2008) a amplificação do gene F é realizada por meio de uma reação de *Nested-PCR*, provavelmente com o intuito de aumentar a quantidade de DNA para posterior digestão com a enzima de restrição. Deste modo, o protocolo de Montes *et al.* (2008) não foi reprodutível neste estudo, porém o único item que difere entre a metodologia descrita e a utilizada foi o método de extração, onde o grupo espanhol extraiu o RNA em uma plataforma automatizada *BioRobot M48* (Qiagen, Alemanha) - que provavelmente apresenta uma melhor eficiência de extração - e no presente estudo a extração foi realizada por um método manual. Uma alternativa para o protocolo de PCR-RFLP seria a utilização de amostras isoladas em cultivo celular, pois apresentaria uma maior carga viral.

Pelo exposto, métodos sensíveis e de baixo custo de subtipagem para o hMPV devem ser padronizados, como SSCP (polimorfismo da conformação da fita simples) ou PCR em tempo real pelo sistema Taqman, para uso rotineiro em laboratórios de diagnóstico clínico.

A padronização e introdução do diagnóstico laboratorial do hMPV em amostras de ANF em pacientes hospitalizados nas unidades de pediatria e TCTH do HC-UFPR por infecção respiratória aguda, demonstrou um aumento de 2,9% no percentual de amostras positivas na pesquisa rotineira de vírus respiratórios do laboratório de virologia desta instituição.

A ampliação desse estudo com a inclusão de pacientes do programa de vigilância epidemiológica do vírus influenza, atendidos em unidades de saúde básica de Curitiba, possibilitou que se analisasse o perfil demográfico e clínico de pacientes ambulatoriais infectados por este novo patógeno, bem como se comparasse os

subtipos do hMPV que circularam entre estes dois grupos de pacientes, no período de 2006 a 2008.

Neste estudo, a pesquisa do hMPV em amostras de ANF coletadas tanto de pacientes hospitalizados no HC-UFPR, como naqueles atendidos nas UBS de Curitiba entre os anos de 2006 a 2008, identificou que o hMPV foi o agente causador da IRA em 4,8% da população analisada.

A incidência mundial do hMPV como agente causador de IRA, varia de 1,5 a 41% (KONIG *et al.*, 2004; MAHALINGAM *et al.*, 2006). Esta variação decorre de alguns parâmetros analisados no estudo em questão, tais como: avaliação de amostras de apenas alguns meses do ano, pesquisa do hMPV somente em amostras previamente negativas para outros vírus respiratórios, método de diagnóstico laboratorial, gene do hMPV pesquisado, método de detecção da reação de PCR, idade dos pacientes incluídos no estudo, utilização de amostras de pacientes hospitalizados ou ambulatoriais e inclusão de pacientes imunocomprometidos (MAGGI *et al.*, 2003; RAFIEFARD *et al.*, 2008).

Ao analisar os resultados dessa pesquisa nos pacientes com IRA que coletaram amostras de ANF nos grupos: hospitalizados e ambulatorial, a infecção pelo hMPV foi causa de IRA em 4,1% e 5,9% dos pacientes, respectivamente. Uma maior frequência do hMPV em pacientes ambulatoriais também foi observado por Cuevas *et al.* (2003). Deve-se ressaltar que este dado refere-se especificamente ao ano de 2007.

Nos pacientes ambulatoriais, o hMPV foi detectado em 4,0% dos casos de IRA, como único patógeno e em 5,9% dos casos de IRA, quando se analisou os quadros de co-infecção com outros vírus respiratórios. A maioria dos pacientes ambulatoriais infectados pelo hMPV era criança (mediana 8,3 anos, variando de 1 a 75 anos). Entretanto, Stockon *et al.* (2002), investigando o hMPV em amostras de pacientes do Programa de Vigilância Epidemiológica do vírus influenza em Londres, entre os anos de 2000 a 2001, detectaram o vírus em 2,2% dos casos de síndromes gripais. A idade mediana dos pacientes infectados foi de 57 anos (variando de 1 a 75 anos).

O hMPV foi o agente causador de IRA em 4,6% dos pacientes imunossuprimidos submetidos à TCTH no HC-UFPR, sendo que este vírus foi apenas detectado em pacientes que realizaram transplante alogênico. Estudos relatam que a incidência do hMPV nos pacientes de transplante de células

hematopoiéticas varia de 3,6 a 5,9% nos pacientes de transplante alogênico e de 1,3 a 2,9% nos pacientes de transplante autólogo (MARTINO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2005a).

Entre os pacientes pediátricos hospitalizados no HC-UFPR, o hMPV foi detectado em 4,0% dos casos de IRA, sendo que este vírus foi o único patógeno detectado em 72,7% dos casos. A maioria dos pacientes infectados tinha menos de 6 meses de idade (mediana 3,2 meses, variando de 1 – 47 meses).

Carneiro *et al.* (2009) ao estudar amostras de crianças com quadro de infecção respiratória, em menores de 5 anos de idade hospitalizadas - no Hospital de Clínicas de Uberlândia (Minas Gerais), entre os anos de 2000 a 2007 - encontraram uma prevalência de 12,3% (14/114) para o hMPV - pesquisando o vírus com os mesmos iniciadores para o gene N que o presente estudo - sendo que a faixa etária mais acometida foi de 21 meses \pm 13,3 meses. Em uma investigação preliminar para detecção do hMPV entre nos meses de março a setembro dos anos de 2000 a 2002 no HC-UFPR, a prevalência deste vírus foi de 6,4% em crianças com uma média de idade de 4,4 \pm 4,2 meses (DEBUR *et al.*, 2007).

Outros estudos brasileiros, porém focando a detecção de outros genes do hMPV, descreveram a prevalência do mesmo em 11,4% das crianças menores de 5 anos de idade (média de 7 \pm 5,9 meses) internadas no Hospital de Clínicas de São Paulo entre os anos de 2003 a 2006 (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e 5,6% em crianças menores de 1 ano de idade (média 4,4 meses) no Hospital de Campinas no ano de 2004 (RICCETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2008).

Tanto a prevalência do vírus, quanto a faixa etária das crianças hospitalizadas no HC-UFPR acometidas pela infecção do hMPV foi menor do que a demonstrada em estudos prévios, inclusive brasileiros, nos quais a prevalência deste vírus variou de 5 a 12% dos casos de hospitalizações, sendo mais frequentemente encontrado em crianças entre 6 a 24 meses de idade (BACH *et al.*, 2004; BOIVIN *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2009; CUEVAS *et al.*, 2003; ESPER *et al.*, 2003; FREYMUTH *et al.*, 2003; HAMELIN *et al.*, 2004; JARTTI *et al.*, 2002; MAGGI *et al.*, 2003; MULLINS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PEIRIS *et al.*, 2003; RICCETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2008; XEPAPADAKI *et al.*, 2004). No entanto, deve-se ressaltar que estes estudos foram realizados em períodos/anos distintos ao do presente trabalho, inclusive a investigação prévia do hMPV no HC-UFPR, realizada no período de março a setembro de 2000 a 2002 (DEBUR *et al.*, 2007). Gaunt *et al.* (2009)

examinando amostras de ANF de crianças hospitalizadas no Reino Unido entre os anos de 2006 a 2008, encontraram uma incidência para o hMPV de 2,0% neste período. Esta observação e os resultados do estudo atual permite sugerir que provavelmente nos anos de 2006 a 2008 a circulação do hMPV tenha sido menor do que nos anos anteriores.

Considerando que o hMPV é um vírus de RNA, alguns fatores podem ter influenciado em uma menor detecção do hMPV pela metodologia de RT-PCR, entre estes: demora no transporte da amostra ao laboratório, carga viral presente no ANF (JOFRE *et al.*, 2007; SARASINI *et al.*, 2006) e a realização da técnica em amostras que foram congeladas (STOCKTON *et al.*, 2002; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004b).

O presente estudo mostra casos de co-infecção entre hMPV e os seguintes vírus respiratórios: hRSV, FLU B e AdV em pacientes pediátricos hospitalizados; PIV3 em pacientes imunossuprimidos (que foram submetidos à TCTH); PIV3, hRSV, AdV e FLU A em pacientes ambulatoriais. A co-infecção hMPV/hRSV foi a mais comumente encontrada (66,7%). Algumas pesquisas demonstram uma associação entre co-infecção hMPV/hRSV e gravidade do quadro respiratório (CUEVAS *et al.*, 2003; GREENSILL *et al.*, 2003; KONIG *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SEMPLE *et al.*, 2005) enquanto outros estudos não confirmam esta hipótese (BIACCHESE *et al.*, 2003; XEPAPADAKI *et al.*, 2004). Ao comparar pacientes mono infectados e co-infectados, as manifestações clínicas, diagnóstico final do quadro clínico respiratório e tratamento utilizado, tanto nos casos hospitalizados (pediatria) como nos ambulatoriais, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para prever gravidade (XEPAPADAKI *et al.*, 2004). Na presente pesquisa, casos de co-infecção entre vírus respiratórios, foram principalmente detectados nas crianças hospitalizadas com idade mediana de 4 meses (variando de 1 a 9 meses) e nos pacientes ambulatoriais com uma mediana de 1 ano de idade (variando de 1 a 40 anos). Esta observação foi também descrita por Aberle *et al.* (2005), onde relatam que geralmente os casos de co-infecção são mais freqüentes em crianças com menos de 1 ano de idade, pelo fato desta faixa etária estar mais susceptível a infecção pelos vírus circulantes. Deve-se ressaltar que a detecção do hMPV foi realizada por um método molecular, enquanto os outros vírus respiratórios foram detectados pela metodologia de imunofluorescência indireta. Dessa maneira, os casos de co-infecções hMPV/outros vírus respiratórios podem estar subestimados (STEMPEL *et al.*, 2009).

Co-infecções de hMPV com bactérias do trato respiratório são pouco estudadas e menos freqüentes que de co-infecção com outros vírus respiratórios, no entanto, já foram descritos casos de co-infecção com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Stenotrophomonas maltophilia* (MAHALINGAM *et al.*, 2006). No presente estudo, houve três episódios de crianças hospitalizadas, que necessitaram de cuidados intensivos, com quadro de sepse, sendo a bactéria *Staphylococcus aureus* a única identificada.

Considerando todos os casos de hMPV detectados nesta pesquisa, é possível dizer que o hMPV foi responsável por IRA em todas as faixas etárias. Alguns estudos mostram, que a infecção pelo hMPV é mais freqüente no sexo masculino (CUEVAS *et al.*, 1003; GRAY *et al.*, 2006b; MAHALINGAM *et al.*, 2006; PEIRIS *et al.*, 2003), entretanto, encontramos nas amostras analisadas, uma maior freqüência do hMPV no sexo feminino (59%) – não havendo contudo, para esse dado, significado estatístico.

As manifestações clínicas da infecção por este vírus variaram de acordo com o grupo pesquisado. Os pacientes ambulatoriais (idade mediana 8,3 anos – variação 6 meses a 75 anos), em sua grande maioria, tiveram infecção no trato respiratório superior, desenvolvendo um quadro de síndrome gripal e foram tratados com sintomáticos. Apenas uma criança (12 meses de idade) desenvolveu quadro de bronquite aguda. No entanto, todos os pacientes pediátricos hospitalizados infectados pelo hMPV (idade mediana 3,2 meses – variação 1 a 47 meses) tiveram comprometimento das vias aéreas inferiores. Carneiro *et al.* (2009) estudaram crianças hospitalizadas e descreveram que a maioria dos pacientes infectados por este vírus (idade média $21 \pm 13,3$ meses) apresentou apenas infecção no trato respiratório superior. Estes dados sugerem que há uma relação entre idade das crianças com infecção no trato respiratório superior e inferior (Williams *et al.*, 2005a), sendo que, geralmente quadros respiratórios mais graves, são visualizados em crianças nos primeiros 12 meses de vida (COSTA *et al.*, 2006), e no presente estudo, foram visualizados principalmente casos de infecções graves nos primeiros 6 meses de vida.

As manifestações clínicas da infecção pelo hMPV nos pacientes pediátricos hospitalizados foram similares aos descritos em estudos prévios (BOIVIN *et al.*, 2004; CHANO *et al.*, 2005; CUEVAS *et al.*, 2003; MULLINS *et al.*, 2004; OSTERHAUS & FOUCHIER, 2003). O hMPV esteve relacionado com um

comprometimento no trato respiratório inferior, sobretudo em menores de 6 meses de idade, causando broncopneumopatias graves (bronquiolite, laringotraqueobronquite, broncopneumonia e pneumonia) (BOUSCAMPBERT-DUCHAMP *et al.*, 2005; CHANO *et al.*, 2005; MAGGI *et al.*, 2003; MULLINS *et al.*, 2004; XEPAPADAKI *et al.*, 2004). Não foi observada otite média nos pacientes estudados, apesar desta apresentação clínica já ter sido descrita (BOIVIN, 2002; MULLINS *et al.*, 2004; OSTERHAUS, 2003; PEIRIS *et al.*, 2003). Entretanto, apenas os sinais e sintomas não se apresentaram suficientes para determinar a etiologia desta infecção, sendo necessários exames laboratoriais para o diagnóstico específico deste patógeno.

Comparações entre o diagnóstico final dos casos em que os pacientes pediátricos foram hospitalizados na primeira semana de manifestação clínica, com o de crianças hospitalizadas após 5 dias do início dos sintomas, foram realizadas com o intuito de determinar, se a evolução do quadro clínico devido à demora da busca pela assistência estava relacionada com a gravidade da infecção. Constatou-se que não houve diferença estatística entre o manejo clínico dos pacientes e o diagnóstico final da infecção, indicando que se trata de uma IRA que necessita de cuidados imediatos e a gravidade depende da resposta da criança à infecção.

Considerando a data do início dos sintomas descrita no prontuário médico, o hMPV foi detectado em uma mediana de 5 dias (variando de 1 a 15 dias) da data do início dos sintomas. Estudos que analisaram amostras coletadas seqüencialmente de crianças infectadas pelo hMPV demonstraram que elas excretam vírus por mais de 10 dias (2 a 3 semanas), sendo que a maior carga viral é obtida de amostras coletadas no pico dos sintomas clínicos, tanto no trato respiratório superior, quanto no inferior. Além disso, acredita-se que a diminuição da carga viral associada a uma infecção grave, esteja relacionada com a resolução dos sintomas clínicos (JOFRE *et al.*, 2007; SARASINI *et al.*, 2006).

Os casos de infecção por hMPV em crianças hospitalizadas estavam envolvidos com infecções respiratórias graves, sendo que a oxigenoterapia foi necessária em 87,5% dos casos por um tempo médio de 8 dias, ventilação mecânica em 29,2% por um tempo médio de 9 dias e admissão em unidades de terapia intensiva em 33,3% dos casos. Dados semelhantes foram relatados por Mahalingam *et al.* (2006). A maioria dos pacientes evoluiu para a resolução da infecção, sem seqüelas. Apenas um óbito ocorreu, sendo que esta paciente

apresentava uma doença de base, era portadora da Síndrome de Down. As crianças com esta síndrome apresentam vários fatores que contribuem para uma infecção pulmonar, o que as tornam mais suscetíveis a uma infecção respiratória viral, sendo esta uma das principais causas de hospitalização e mortalidade (SOARES *et al.*, 2004).

Observou-se que a mediana de dias de hospitalização destas crianças foi de 11 dias (variando de 2 a 84 dias), maior do que previamente relatado, cerca de 7 dias (BACH *et al.*, 2004; BOIVIN *et al.*, 2002; JARTTI *et al.*, 2002; SAMRANSAMRUAJKIT *et al.*, 2006; XEPAPADAKI *et al.*, 2004), demonstrando a gravidade e o custo da hospitalização devido à infecção pelo hMPV na população em estudo.

Os pacientes que foram submetidos à TCTH e tiveram infecção respiratória pelo hMPV, foram infectados após alta médica da unidade de isolamento do transplante. Normalmente, os pacientes voltam ao hospital diariamente para receber tratamento medicamentoso, geralmente por um período de 100 dias após o transplante (D +100). Dois pacientes foram infectados pelo hMPV nos primeiros 30 dias após o TCTH, período este em que os pacientes são submetidos a uma imunossupressão intensa, para evitar a doença do enxerto contra o hospedeiro, sendo portanto mais suscetíveis a infecções. Os demais pacientes tiveram a infecção no período compreendido entre o 30º e 90º dia após o transplante. Provavelmente, estas infecções ocorreram devido ao contato com pacientes infectados no próprio hospital ou com pessoas infectadas da comunidade (RABONI *et al.*, 2003). A maioria dos pacientes infectados teve apenas infecção no trato respiratório superior, usualmente com sintomas iniciais de tosse e coriza, conforme relatado em estudos prévios (ENGLUND *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007). Estas manifestações clínicas foram manejadas com tratamento sintomático. Entretanto, 25% dos pacientes evoluíram para infecção no trato respiratório inferior. Estes pacientes eram crianças, uma de 3 e outra de 10 anos, e tiveram doadores não aparentados de células hematopoiéticas. Os casos de pneumonia nestes pacientes, provavelmente ocorreram devido ao quadro de imunossupressão dos mesmos, que contribuiu para uma resposta imune deficiente. Adicionalmente, esses casos podem ter sido também de uma primoinfecção para o qual não apresentavam resposta imunológica (BOECKH *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). A criança com 10 anos de idade estava co-infectada com PIV3 e alguns estudos sugerem que quadros de co-

infecções, especialmente em pacientes imunossuprimidos, usualmente levam a uma infecção no trato respiratório inferior (ABERLE *et al.*, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2005a). É importante ressaltar que os pacientes que desenvolveram quadros de pneumonia estavam linfopênicos (dados não mostrados), o que concorda com a hipótese de que a linfopenia é um fator de predisposição a infecções virais no trato respiratório inferior (MARTINO *et al.*, 2005).

Há poucos dados sobre manifestações clínicas dos pacientes ambulatoriais infectados com o hMPV, pois a grande maioria dos estudos focaliza pacientes hospitalizados (CUEVAS *et al.*, 2003) e quando há inclusão de pacientes ambulatoriais, normalmente envolvem a população adulta. Até o momento, em adultos, este vírus tem sido descrito ocasionando quadros gripais (STOCKON *et al.*, 2002) e exacerbação da asma (WILLIAMS *et al.*, 2005b). No entanto, há descrição de casos de pneumonia em pacientes adultos imunocomprometidos ou idosos infectados pelo hMPV (BOIVIN *et al.*, 2002; ENGLUND *et al.*, 2006). No presente estudo, os pacientes adultos ambulatoriais apresentaram quadros de síndromes gripais, conforme também descrito por Falsey *et al.* (2003) e Rafiefard *et al.* (2008). Os pacientes foram tratados, principalmente, com analgésicos e antitérmicos e, menos frequentemente, com antibióticos, antiinflamatórios, broncodilatadores e anti-histamínicos.

O fato do hMPV ter sido detectado causando IRA nos pacientes com mais de 1 ano de idade sugere que a infecção natural pelo hMPV promove uma imunidade não duradoura, sendo que re-infecções podem ocorrer ao longo da vida em qualquer faixa etária (ENDO *et al.*, 2008; FALSEY *et al.*, 2003; HAMELIN *et al.*, 2005; VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2007).

A resposta imune para o hMPV inclui tanto a produção de anticorpos (Ig A e Ig G) neutralizantes para as proteínas F e G do vírus, quanto à indução de células T específicas (ENDO *et al.*, 2008). Os anticorpos (Ig A e Ig G) apresentam um papel importante na proteção contra as doenças causadas pelos vírus respiratórios (CROWE & WILLIAMS, 2003). Nas infecções respiratórias, a IgA secretada previne a re-infecção por uma cepa homóloga do vírus, durante a mesma estação epidemiológica (pois estes anticorpos tem uma vida curta e apenas níveis significantes são encontrados nos primeiros meses após a infecção), porém não protege do envolvimento no trato respiratório inferior. Anticorpos neutralizantes, principalmente IgG no soro, para as glicoproteínas de superfície viral, são

importantes na proteção das vias aéreas inferiores (CROWE & WILLIAMS, 2003; GLEZEN *et al.*, 1986).

Estudos de soroprevalência por ensaios de neutralização mostraram que o título de anticorpos neutralizantes de crianças infectadas com hMPV aumenta para ambos os genótipos A e B do vírus, embora esse aumento tenha sido quatro vezes maior para o genótipo infectante e com uma duração aproximada de 3 meses. Desta forma, observa-se que os anticorpos neutralizantes no período logo após a infecção, protegem contra outros genótipos de hMPV por um período aproximado de 100 dias (MATZUSAKI *et al.*, 2008). Estes achados mostram que há um declínio no nível de anticorpos após alguns meses da primeira infecção pelo vírus e, isso acontece mais significativamente, se esta infecção ocorre nos primeiros meses de vida (CROWE & WILLIAMS, 2003), o que justifica o fato do hMPV ser encontrado em todas as faixas etárias do presente estudo.

Normalmente, os casos de re-infecção pelo hMPV ficam restritos ao trato respiratório superior, provavelmente pela proteção dos anticorpos IgG específicos circulantes (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2007). Isto explica os casos de síndromes gripais observados nos adultos ambulatoriais. Em pacientes com predisposição para doença pulmonar (doença de base, imunossupressão), a infecção pode evoluir para o comprometimento do trato respiratório inferior (BOIVIN *et al.*, 2007; HAMELIN *et al.*, 2005). Conforme observado no presente estudo, as pneumonias ocorreram em pacientes maiores de 1 ano de idade que foram submetidos à TCTH. No entanto, deve-se ressaltar que estas observações só foram feitas, com base nos dados obtidos com a população estudada, pacientes pediátricos e imunossuprimidos hospitalizados e pacientes ambulatoriais, e que a pesquisa não incluiu amostras de ANF de pacientes adultos hospitalizados em outras unidades clínicas do HC-UFPR, pois a investigação de vírus respiratórios não é realizada de rotina nestes pacientes. Logo, não se pode generalizar que todos os casos de re-infecção respiratória viral em um indivíduo adulto, sem doença de base, ficarão limitados ao trato respiratório superior. Estudos abordando este tema deverão ser realizados.

Provavelmente as crianças hospitalizadas nas unidades de pediatria do HC-UFPR com infecção pelo hMPV foram casos de primoinfecção (HAMELIN *et al.*, 2005), pois eram crianças com idade inferior a 6 meses e não apresentavam doenças de base que pudessem predispor para um quadro mais grave. O mecanismo de doença pulmonar pelo hMPV ainda é desconhecido, porém sugere-

se que a resposta inflamatória no trato respiratório esteja fortemente envolvida com a sua evolução clínica (BAO *et al.*, 2008; GUERRERO-PLATA *et al.*, 2005; HAMELIN *et al.*, 2006; JARTTI *et al.*, 2002; LAHAM *et al.*, 2004; MONTÓN *et al.*, 1999; SCHUTTE *et al.*, 1996). Crianças no primeiro ano de vida são menos tolerantes a infecções envolvendo o trato respiratório inferior do que indivíduos com uma idade maior, em parte porque o diâmetro das vias aéreas é estreito e assim mais susceptível a obstruções (COSTA *et al.*, 2006) e, também, porque a resposta imune é imatura (CROWE & WILLIAMS, 2006). Estas crianças não conseguem produzir anticorpos neutralizantes eficazes para as proteínas glicosiladas (F e G do hMPV), pois apresentam uma frequência reduzida de mutação somática para originar um anticorpo específico contra o vírus, e uma diminuída capacidade de troca de classe de anticorpos. Além disso, a secreção de citocinas é pequena, sendo também deficiente na produção de interferon (COLLINS & GRAHAM, 2008). Estudos sugerem que infecções respiratórias repetidas induzem à maturação da resposta imunológica na criança, diminuindo a incidência e a gravidade das infecções respiratórias (COSTA *et al.*, 2006), o que se observou nos casos de infecção em crianças com mais de 12 meses de vida.

Além do fato de que crianças com baixa faixa etária serem mais propensas a desenvolver quadros respiratórios mais graves (COSTA *et al.*, 2006), alguns estudos relatam outros fatores, como casos de co-infecção com outros vírus respiratórios, conforme citado anteriormente (CUEVAS *et al.*, 2003; GREENSILL *et al.*, 2003; KONIG *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009), carga viral (BOSIS *et al.*, 2008) e subtipo do vírus (VICENTE *et al.*, 2006).

Bosis *et al.* (2008) e Gerna *et al.* (2007) estudaram casos de infecção respiratória aguda do trato respiratório superior e inferior em crianças, correlacionando a gravidade com as variáveis: genótipos e carga viral. Observaram que não houve correlação entre o genótipo do hMPV com as manifestações clínicas e, que as infecções no trato respiratório inferior apresentavam uma carga viral significativamente maior do que as infecções apenas no trato respiratório superior. Além disso, a carga viral foi maior nos pacientes hospitalizados do que nos pacientes ambulatoriais. Estudos prévios que descreveram a relação entre o genótipo do hMPV e a gravidade da doença mostraram em alguns casos que não há diferença (AGAPOV *et al.*, 2006; MATSUZAKI *et al.*, 2008) e, em outros, sugerem que há uma associação entre genótipo A e gravidade (VICENTE *et al.*, 2006).

Embora esta pesquisa tenha detectado os subtipos A1, A2a, B1 e B2 do hMPV, nenhuma correlação foi observada entre o subtipo viral e gravidade da infecção. No entanto, há a necessidade de um maior número de amostras para cada subtipo viral a fim de avaliar por métodos estatísticos esta correlação.

No presente estudo o genótipo B foi o mais detectado, sendo encontrado em 73% das amostras de pacientes de todas as faixas etárias. Boivin *et al.* (2004) reportaram que em crianças menores de 3 anos de idade o genótipo A do hMPV é três vezes mais comum que o genótipo B. O genótipo B é descrito como o mais comum em adultos (BOIVIN *et al.*, 2004). Rafiefard *et al.* (2008) descreveram que o genótipo A é predominante em todas as faixas etárias. Estas diferenças de resultados entre os estudos podem ser explicadas pela flutuação dinâmica entre os dois genótipos em diferentes países/continentes (RAFIEFARD *et al.*, 2008).

Entre os anos de 2006 a 2008, o hMPV foi detectado praticamente durante todo o ano, sendo que sua maior circulação foi observada em dois momentos: um no outono e outro no inverno e início da primavera, correlacionando-se com os meses de baixas temperaturas e chuvas na cidade de Curitiba (PR). Em seu estudo, na região nordeste do Brasil, Cuevas *et al.* (2003) relatam uma maior incidência de infecções por hMPV em períodos de estações chuvosas.

Nesta pesquisa, todos os genótipos (A e B) do hMPV foram detectados. Ao contrário do descrito por Carneiro *et al.* (2009), o presente trabalho observou que diferentes genótipos de hMPV podem co-circular durante um mesmo ano, sendo que os subtipos A1 e B2 do hMPV foram detectados nos meses de agosto, setembro e outubro de 2006. Matsuzaki *et al.* (2008) analisando amostras do Japão e Oliveira *et al.* (2009) com amostras de São Paulo também descreveram a circulação dos genótipos A e B em 2006. No ano de 2007 apenas foi detectado amostras do genótipo B. Em maio e junho de 2007 foi observado a maior incidência do hMPV em todo o período do estudo (51,6%), entretanto, o subtipo B2 do hMPV foi predominante até o mês de maio e a partir de então predominou o subtipo B1. E, no ano de 2008 apenas foi detectado o subtipo A2a. Gaunt *et al.* (2009) analisando amostras do Reino Unido também detectaram os subtipos A2, B1 e B2 nos anos de 2006 a 2008.

Alguns estudos relatam a detecção de três ou até mesmo dos quatro subtipos do hMPV em um mesmo ano (CHUNG *et al.*, 2008; SLOOTS *et al.*, 2006). Embora este estudo tenha sido realizado com amostras de três anos consecutivos, foi

observado que pelo menos dois subtipos de hMPV circulam no ano, o que ocorreu nos anos de 2006 e 2007. Constatou-se que o genótipo do hMPV mudou após um período de circulação (subtipos A1 e B2 em 2006; subtipos B2 e B1 em 2007 e subtipo A2a em 2008). Carneiro *et al.* (2009) em um estudo com amostras de pacientes pediátricos do Hospital de Clínicas de Uberlândia (Minas Gerais) observaram que os subtipos A2a e A1 foram detectados em amostras do ano de 2003, os subtipos B1 e B2 em 2004 e o subtipo B2 no ano 2006. Oliveira *et al.* (2009) estudando casos de hMPV em São Paulo demonstraram que o subtipo B1 foi predominante nos anos de 2004 e 2005 e os subtipos B2 e A2 foram predominantes em 2006. No presente estudo, nos anos onde mais de um subtipo de hMPV foi detectado, o subtipo B2 foi o subtipo mais freqüente (47%) e circulou desde a primavera de 2006 até a primavera de 2007. Mais análises em anos consecutivos deverão ser realizadas para verificar como acontece a mudança de subtipo na circulação do hMPV (AGAPOV *et al.*, 2006; LARCHER *et al.*, 2008; LUDEWICK *et al.*, 2005; MACKAY *et al.*, 2004).

Uma mudança periódica do genótipo/subtipo predominante tem sido descrito em outros estudos e sugerem que a mudança antigênica faz parte do mecanismo de evasão do vírus ao sistema imune (LARCHER *et al.*, 2008). Matsuzaki *et al.* (2008) explicam que o genótipo predominante e a faixa etária afetada podem estar fortemente relacionadas com o estado imunológico genótipo-específico da população de uma determinada região. Conforme descrito anteriormente, sabe-se que a imunidade aos vírus respiratórios ocorre por um tempo limitado após a primeira infecção (principalmente pelo anticorpo IgA), assim sendo, uma maneira do vírus se manter na população é a constante mudança no genótipo/subtipo. Além disso, observou-se que a maior incidência do hMPV (62,3%) foi em crianças menores de 5 anos de idade, que por sua vez excretam o vírus por mais de duas semanas desde o início das manifestações clínicas (SARASINI *et al.*, 2006), possivelmente sendo os responsáveis pela disseminação do vírus, até mesmo pelo fato da menor noção de higiene pessoal e contato próximo com os familiares.

A análise filogenética das amostras positivas para hMPV detectadas neste estudo, mostraram que as cepas que circularam nos pacientes pediátricos e nos adultos foram similares, bem como entre os pacientes ambulatoriais e hospitalares, indicando que o subtipo circulante em um dado momento do ano é o mesmo em

toda a população, podendo-se sugerir que os casos diagnosticados neste estudo trataram-se de infecções adquiridas na comunidade.

A padronização de um protocolo molecular, utilizado hoje de rotina no laboratório de virologia do HC-UFPR, para a detecção do hMPV, permitiu determinar a prevalência local deste vírus, conseqüentemente diminuindo o número de casos de IRA sem patógeno conhecido associado. Adicionalmente, este diagnóstico possibilitou o conhecimento das faixas etárias mais acometidas e formas de evolução clínica desta infecção. A determinação do agente etiológico das infecções respiratórias proporciona ao médico, informações fundamentais que orientarão a conduta terapêutica.

Atualmente os pacientes internados com infecções respiratórias graves utilizam antibióticos de amplo espectro e por tempo prolongado, gerando altos custos ao serviço, assim como contribuindo para a seleção de cepas bacterianas multirresistentes. Definir um agente viral como o responsável pelo quadro infeccioso permite ao médico a retirada dos antimicrobianos ou a redução de tempo de uso, conseqüentemente diminuindo os custos do internamento.

Este estudo forneceu à instituição um conhecimento prévio da morbidade, sazonalidade, bem como variabilidade genética dos hMPVs que estão circulando na cidade de Curitiba. Essas informações forneceram subsídios para o controle de disseminação do vírus, principalmente em unidades fechadas dentro do hospital. Este conhecimento também é estendido a outros hospitais e aos serviços públicos de vigilância epidemiológica, contribuindo com dados para a prevenção desta infecção, conhecimento da população mais acometida pelo vírus e fornecimento de subsídios para o desenvolvimento de vacinas, de modo a prevenir infecções respiratórias graves.

8 CONCLUSÃO

- A metodologia padronizada de RT-PCT para detectar o gene N do hMPV permitiu a análise retrospectiva das amostras de ANF coletadas entre os anos de 2006 a 2008, com um limite de detecção de 180 cópias/reação e sem reação cruzada com outros vírus respiratórios testados;
- Não foi conseguido isolar o hMPV em cultivo celular, tanto pelo método convencional quanto pela centrifugação rápida em linhagens de LLC-MK2 e HEp-2;
- O seqüenciamento nucleotídico a partir das amostras positivas para hMPV permitiu a caracterização genética do vírus, sendo subtipados 83% destes e identificados os subtipos A1, A2a, B1 e B2. A metodologia de PCR-RFLP permitiu a subtipagem de 8,2% das amostras positivas para hMPV, sendo identificados os subtipos A2a e B2. O resultado dos dois métodos de subtipagem utilizados foi coincidente;
- Entre os anos de 2006 a 2008 circularam os dois genótipos do hMPV, observou-se uma mudança anual entre o subtipo predominante. No ano de 2006 circularam os subtipos A1 e B2, em 2007 os subtipos B1 e B2 e em 2008 o subtipo A2a;
- O vírus circulou em dois momentos no ano: um no outono e outro no inverno e início da primavera, o que correlaciona com meses de baixas temperaturas e chuvas na cidade de Curitiba (PR);
- O hMPV esteve presente em 4,8% dos pacientes com IRA estudados, sendo encontrado em 4,0% dos pacientes pediátricos hospitalizados no HC-UFPR, 4,6% dos pacientes imunossuprimidos submetidos à TCTH no HC-UFPR e em 5,9% dos pacientes ambulatoriais participantes do programa de vigilância epidemiológica do vírus influenza. O hMPV foi encontrado em todas as faixas etárias;
- Os pacientes hospitalizados com menos de 6 meses de idade infectados pelo hMPV desenvolveram infecção nas vias aéreas inferiores (broncopneumopatias). A maioria dos pacientes imunossuprimidos e ambulatoriais apresentaram manifestações clínicas apenas no trato respiratório superior;
- Não se observou correlação entre o subtipo viral e gravidade da infecção nas amostras analisadas.

9 PERSPECTIVAS

- A introdução da metodologia de biologia molecular como técnica de rotina para a pesquisa do hMPV e sua subtipagem por um maior número de anos consecutivos permitirá uma melhor compreensão da alternância entre genótipos/subtipos ao longo dos anos, bem como conhecer a dinâmica desta infecção viral em nossa comunidade.
- Padronização de metodologias sensíveis para subtipagem do vírus, como SSCP ou PCR em tempo real utilizando as amostras detectadas neste estudo, permitirão reduzir o custo da subtipagem e o sua aplicação no diagnóstico laboratorial.
- Ampliar a pesquisa do hMPV incluindo os pacientes adultos hospitalizados por IRA em diferentes unidades clínicas, tal análise fornecerá informações importantes para determinar o risco desta infecção progredir para complicações no trato respiratório inferior nesta faixa etária.
- Introduzir a metodologia molecular (RT-PCR e PCR) para o diagnóstico laboratorial dos outros vírus respiratórios, tais como: FLU A, FLU B, AdV, hRSV, PIV 1, 2 e 3, bem como incluir a detecção do bocavírus humano, coronavírus humano e rinovírus humano, nas amostras analisadas permitirá determinar a incidência real de cada um dos vírus, bem como dos casos de co-infecção viral.

REFERÊNCIAS

- ABERLE, J. H.; ABERLE, S. W.; PRACHER, E.; HUTTER, H. P.; KUNDI, M.; POPOW-KRAUPP, T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 24, p. 605-610, 2005.
- AGAPOV, E.; SUMINO, K. C.; GAUDREAU-KEENER, M.; STORCH, G. A.; HOLTZMAN, M. J. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, p. 396–403, 2006
- ALLANDER, T. Human bocavirus. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 41, p. 29-33, 2008.
- ALTO, W.A. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, Waltham, v. 17, n. 6, p. 466-469, 2004.
- ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUSA, M. A.; MOTA, S. B.; MCAULIFFE, M. I.; GEIST, F. C.; CARVALHO, E. P.; FERNANDES, M. C.; GUERRANT, R. L. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 164, p. 252 – 258, 1991.
- BACH, N.; CUVILLON, D.; BROUARD, J.; LAFAY, F.; FREYMUTH, F.; LEGRAND, L.; GUILLOIS, B.; DUHAMEL, J. F. Infections respiratoires aiguës à metapneumovirus humain chez l'enfant : études descriptives et comparative avec le virus respiratoire syncytial. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v. 11, p. 212-215, 2004.
- BAO, X.; LIU, T.; SPETCH, L.; KOLLI, D.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A. Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection. **Virology**, New York, v.368, p.91-101, 2007.
- BAO, X.; SINHA, M.; LIU, T.; HONG, C.; LUXON, B. A.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A. Identification of human metapneumovirus-induced gene networks in airway epithelial cells by microarray analysis. **Virology**, New York, v. 374, n. 1, p.114-127, 2008.
- BASTIEN, N.; NORMAND, S.; TAYLOR, T.; WARD, D.; PERET, T. C.; BOIVIN, G.; ANDERSON, L. J.; LI, Y. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. **Virus Research**, Amsterdam, v. 93, p.51–62, 2003.
- BIACCHESI, S.; SKIADOPOULOS, M. H.; BOIVIN, G.; HANSON, C. T.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L.; BUCHHOLZ, U. J. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. **Virology**, New York, v. 315, p.1–9, 2003.

BIACCHESE, S.; SKIADOPOULOS, M. H.; TRAN, K. C.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L.; BUCHHOLZ, U. J. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. **Virology**, New York, v. 321, p. 247-259, 2004.

BIACCHESE, S.; SKIADOPOULOS, M. H.; YANG, L.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L.; BUCHHOLZ, U. J. Rapid human metapneumovirus microneutralization assay based on green fluorescent protein expression. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 128, p. 192-197, 2005.

BOECKH, M.; ERARD, V.; ZERR, D.; ENGLUND, J. Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. **Pediatric Transplantation**, Copenhagen, v. 9, n. 7, p. 48-54, 2005.

BOIVIN, G.; ABED, Y.; PELLETIER, G.; RUEL, L.; MOISAN, D.; COTE, S.; PERET, T. C.; ERDMAN, D. D.; ANDERSON, L. J. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, p.1330-1334, 2002.

BOIVIN, G.; DE SERRES, G.; COTE, S.; GILCA, R.; ABED, Y.; ROCHETTE, L.; BERGERON, M. G.; DERY, P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta v. 9, n. 6, p.634-640, 2003.

BOIVIN, G.; MACKAY, I.; SLOOTS, T. P.; MADHI, S.; FREYMUTH, F.; WOLF, D.; SHEMER-AVNI, Y.; LUDEWICK, H.; GRAY, G. C.; LEBLANC, E. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, p.1154–1157, 2004.

BOIVIN, G.; DE SERRES, G.; HAMELIN, M. E.; COTE, S.; ARGOUIN, M.; TREMBLAY, G.; MARANDA-AUBUT, R.; SAUVAGEAU, C.; OUAKKI, M.; BOULIANNE, N.; COUTURE, C. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, p. 1152-1158, 2007.

BOSIS, S.; ESPOSITO, S.; OSTERHAUS, A. D.; TREMOLATI, E.; BEGLIATTI, E.; TAGLIABUE, C.; CORTI, F.; PRINCIPI, N.; NIESTERS, H. G. Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p.286-290, 2008.

BOUSCAMPERT-DUCHAMP, M.; LINA, B.; TROMPETTE, A.; MORET, H.; MOTTE, J.; ANDREOLETTI, L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n.3, p. 1411-1414, 2005.

Brasil, Sistema de Informações em saúde, 2009. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 10/06/2010.

BROOR, S.; BHARAJ, P.; CHAHAR, H. S. Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 33, p. 483–493, 2008.

CALICO, I.; LOWAK, M.; BAS, A.; BETBESE, M. T.; FUENTES, F.; LOAIZA, N. *et al.* [A comparative study of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, and culture for diagnosing metapneumovirus infection]. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 27, p. 322-325, 2009.

CANE, P. A.; VAN DEN HOOGEN, B. G.; CHAKRABARTI, S.; FEGAN, C. D.; OSTERHAUS, A. D. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 31, p. 309–310, 2003.

CARNEIRO, B. M.; YOKOSAWA, J.; ARBIZA, J.; COSTA, L. F.; MIRAZO, S.; NEPOMUCENO, L. L.; OLIVEIRA, T. F.; GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FREITAS, G. R.; PAULA, N. T.; QUEIROZ, D. A. Detection of all four human metapneumovirus subtypes in nasopharyngeal specimens from children with respiratory disease in Uberlandia, Brazil. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 81, n. 10, p.1814-1818, 2009.

CARR, M. J.; MCCORMACK, G.P.; CROWLEY, B. Human metapneumovirus-associated respiratory tract infections in the Republic of Ireland during the influenza season of 2003–2004. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 11, p. 366–371, 2005.

CASAS, I.; POWELL, L.; KLAPPER, P. E.; CLEATOR, G. M. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 25-36, 1995.

CASAS, I.; POZO, F. Síndrome respiratorio agudo grave, gripe aviar e infección por metapneumovirus humano. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 23, p. 438-447, 2005.

CHAN, P. K.; TAM, J. S.; LAM, C. W.; CHAN, E.; WU, A.; LI, C. K.; BUCKLEY, T. A.; NG, K. C.; JOYNT, G. M.; CHENG, F. W.; TO, K. F.; LEE, N.; HUI, D. S.; CHEUNG, J. L.; CHU, I.; LIU, E.; CHUNG, S. S.; SUNG, J. J. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 9, p. 1058-1063, 2003.

CHANO, F.; ROUSSEAU, C.; LAFERRIERE, C.; COUILLARD, M.; CHAREST, H. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 5520-5525, 2005.

CHUNG, J. Y.; HAN, T. H.; KIM, S. W.; HWANG, E. S. Genotype variability of human metapneumovirus, South Korea. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, n. 5, p. 902-905, 2008.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **The Journal of Virology**, Washington, v. 82, n.5, p. 2040-2055, 2008.

COSTA, L. F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O. C.; OLIVEIRA, T. F.; SILVEIRA, H. L.; NEPOMUCENO, L. L.; MOREIRA, L. S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO, L. Z.; QUEIROZ, D. A. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias no Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 301-306, 2006.

COTÊ, S.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 8, p. 3631-3635, 2003.

COYLE, P. V.; ONG, G. M.; O'NEILL, H. J.; MCCAUGHEY, C.; DE ORNELLAS, D.; MITCHELL, F.; MITCHELL, S. J.; FEENEY, S. A.; WYATT, D. E.; FORDE, M.; STOCKTON, J. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. **BMC Microbiology**, v. 4 (Oct 25), p. 41, 2004.

CROWE JR, J. E; WILLIAMS, J. V. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, p.112-119, 2003.

CUEVAS, L. E.; NASSER, A. M.; DOVE, W.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1626-1628, 2003.

DADOS HC-UFPR – ANOS 1998-2009. Disponível em: <<http://www.hc.ufpr.br/Templates/informacoes/dados/assistencia.html>>. Acesso em 10/06/2010.

DARE, R.; SANGHAVI, S.; BULLOTTA, A.; KEIGHTLEY, M. C.; GEORGE, K. S.; WADOWSKY, R. M.; PATERSON, D. L.; MCCURRY, K. R.; REINHART, T. A.; HUSAIN, S.; RINALDO, C. R. Diagnosis of Human Metapneumovirus Infection in Immunosuppressed Lung Transplant Recipients and Children Evaluated for Pertussis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 548-552, 2007.

DARNIOT, M.; PETRELLA, T.; AHO, S.; POTHIER, P.; MANOHA, C. Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice. **Vaccine**, v. 23, n. 36, p. 4473–4480, 2005.

DAUBIN, C.; PARIENTI, J. J.; VINCENT, S.; VABRET, A.; DU CHEYRON, D.; RAMAKERS, M.; FREYMUTH, F.; CHARBONNEAU, P. Epidemiology and clinical outcome of virus-positive respiratory samples in ventilated patients: a prospective cohort study. **Critical Care**, v.10, p. R142, 2006.

DEBUR, M. C.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C. N.; VIDAL, L. R.; NOGUEIRA, M. B.; DE ALMEIDA, S. M.; RABONI, S. M. Acute respiratory infection

by human metapneumovirus in children in southern Brazil. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 39, p. 59-62, 2007.

DEFFRASNES, C.; CÔTÉ, S.; BOIVIN, B. Analysis of Replication Kinetics of the Human Metapneumovirus in Different Cell Lines by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 488-490, 2005.

DOMACHOWSKE, J.B. Human metapneumovirus: a newly described respiratory pathogen of humans. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 25, n. 3, p. 17-20, 2003.

EASTON, A.J.; DOMACHOWSKE, J.B.; ROSENBERG, H.F. Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

EBIHARA, T.; ENDO, R.; KIKUTA, H.; ISHIGURO, N.; YOSHIOKA, M.; MA, X.; KOBAYASHI, K. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 70, p. 281-283, 2003.

EBIHARA, T.; ENDO, R.; ISHIGURO, N.; NAKAYAMA, T.; SAWADA, H.; KIKUTA, H. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5944-5946, 2004.

EBIHARA, T.; ENDO, R.; MA, X.; ISHIGURO, N.; KIKUTA, H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1138-1141, 2005.

ENDO, R.; EBIHARA, T.; ISHIGURO, N.; TERAMOTO, S.; ARIGA, T.; SAKATA, C.; HAYASHI, A.; ISHIKO, H.; KIKUTA, H. Detection of four genetic subgroup-specific antibodies to human metapneumovirus attachment (G) protein in human serum. **Journal of General Virology**, London, v. 89, p. 1970, 2008.

ENGLUND, J. A.; BOECKH, M.; KUYPERS, J.; NICHOLS, W. G.; HACKMAN, R. C.; MORROW, R. A.; FREDRICKS, D. N.; COREY, L. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 144, n. 5, p. 344-349, 2006.

ESPER, F.; BOUCHER, D.; WEIBEL, C.; MARTINELLO, R. A.; KAHN, J. S. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. **Pediatrics**, Evanston, v. 111, n. 6 Pt 1, p. 1407-1410, 2003.

ESPER, F.; MARTINELLO, R. A.; BOUCHER, D.; WEIBEL, C.; FERGUSON, D.; LANDRY, M. L.; KAHN, J. S. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p. 1388-1396, 2004.

FALSEY, A. R.; ERDMAN, D.; ANDERSON, L. J.; WALSH, E. E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, p. 785-790, 2003.

FALSEY, A.R.; CRIDDLE, M.C.; WALSH, E.E. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 46-50, 2006.

FAUQUET, C.M. *et al.* Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, Oxford, United Kingdom, 2005. Disponível em: <[http:// http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1](http://http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1)>. Acesso em: 10/06/2010.

FELDMAN, S.A.; AUDET, S.; BEELER, J.A. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, p. 6442-6447, 2000.

FENWICK, F.; YOUNG, B.; MCGUCKIN, R.; ROBINSON, M. J.; TAHA, Y.; TAYLOR, C. E.; TOMS, G. L. Diagnosis of human metapneumovirus by immunofluorescence staining with monoclonal antibodies in the North-East of England. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 40, p. 193-196, 2007.

FOX, J.D. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 40, n. Suppl 1, p. S24-30, 2007.

FREYMOUTH, F.; VABRET, A.; LEGRAND, L.; ETERRADOSSI, N.; LAFAY-DELAIRE, F.; BROUARD, J.; GUILLOIS, B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 22, p. 92-94, 2003.

FREYMUTH, F.; VABRET, A.; LEGRAND, L.; DINA, J.; GOUARIN, S.; CUVILLON-NIMAL, D.; BROUARD, J. Métapneumovirus humain. **Pathologie-biologie**, Paris, v. 57, n. 2, p. 133-141, 2009.

GALIANO, M.; TRENTO, A.; VER, L.; CARBALLAL, G.; VIDELA, C. Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 78, n. 5, p. 631-637, 2006.

GALINSKI, M.S. Paramyxoviridae-Transcription and Replication. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 39, p. 129-162, 1991.

GAUNT, E.; MCWILLIAM-LEITCH, E. C.; TEMPLETON, K.; SIMMONDS, P. Incidence, molecular epidemiology and clinical presentations of human metapneumovirus; assessment of its importance as a diagnostic screening target. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 46, n. 4, p. 318-324, 2009.

GERNA, G.; CAMPANINI, G.; ROVIDA, F.; SARASINI, A.; LILLERI, D.; PAOLUCCI, S.; MARCHI, A.; BALDANTI, F.; REVELLO, M. G. Changing circulation rate of human

metapneumovirus strains and types among hospitalized pediatric patients during three consecutive winter-spring seasons. **Archives of Virology**, Vienna, v. 150, p. 2365–2375, 2005.

GERNA, G.; SARASINI, A.; PERCIVALLE, E.; CAMPANINI, G.; ROVIDA, F.; MARCHI, A.; BALDANTI, F. Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 40, p. 236-240, 2007.

GLEZEN, W. P.; TABER, L. H.; FRANK, A. L.; KASEL, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **American Journal of Diseases of Children**, Chicago, v. 140, n. 6, p. 543-546, 1986.

GRAY, G. C.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; SANCHEZ, J. L.; NEVILLE, J. S.; OLSON, J.; LEBECK, M. G.; MCCARTHY, T.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 347–350, 2006a.

GRAY, G. C.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; ERDMAN, D. D.; NOBBS, N. D.; ABED, Y.; DOERN, G. V.; STARKS, S. E.; BOIVIN, G. Multi-year study of human metapneumovirus infection at a large US Midwestern Medical Referral Center. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 269-276, 2006b.

GREENSILL, J.; MCNAMARA, P. S.; DOVE, W.; FLANAGAN, B.; SMYTH, R. L.; HART, C. A. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, p. 372–375, 2003.

GUERRERO-PLATA, A.; CASOLA, A.; GAROFALO, R.P. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 14992–14997, 2005.

HAMELIN, M.E.; ABED, Y. BOIVIN, G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, n. 7, p. 983-990, 2004.

HAMELIN, M.E.; BOIVIN, G. Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Metapneumovirus Serology Based on a Recombinant Viral Protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 12, p. 249-253, 2005.

HAMELIN, M. E.; COTE, S.; LAFORGE, J.; LAMPRON, N.; BOURBEAU, J.; WEISS, K.; GILCA, R.; DESERRES, G.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, p. 498–502, 2005.

HAMELIN, M. E.; PRINCE, G. A.; GOMEZ, A. M.; KINKEAD, R.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, p. 1634–1642, 2006.

HOWE, M. Australian find suggests worldwide reach for metapneumovirus. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 202, 2002.

HUCK, B.; SCHARF, G.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; PUPPE, W.; WEIGL, J.; FALCONE, V. Novel human metapneumovirus sublineage. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 147–150, 2006.

ISHIGURO, N.; EBIHARA, T.; ENDO, R.; MA, X.; KIKUTA, H.; ISHIKO, H.; KOBAYASHI, K. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 8, p. 3406–3414, 2004.

ISHIGURO, N.; EBIHARA, T.; ENDO, R.; MA, X.; SHIROTSUKI, R.; OCHIAI, S.; ISHIKO, H.; KIKUTA, H. Immunofluorescence Assay for Detection of Human Metapneumovirus-Specific Antibodies by Use of Baculovirus-Expressed Fusion Protein. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 12, p. 202–205, 2005.

JARTTI, T.; VAN DEN HOOGEN, B.; GAROFALO, R. P.; OSTERHAUS, A. D.; RUUSKANEN, O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. **Lancet**, London, v. 360, p. 1393–1394, 2002.

JOFRE, M. L.; LUCHSINGER, F. V.; ZEPEDA, F. G.; ROJAS, C. A.; MUNOZ, A. A. Apnea como forma de presentación de una infección por metapneumovirus humano. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 24, n. 4, p. 313–318, 2007.

KAHN, J.S. Epidemiology of Human Metapneumovirus. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 3, p. 546–557, 2006.

KAHN, J.S. Newly discovered respiratory viruses: significance and Implications. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 7, p. 478–483, 2007.

KAIDA, A.; IRITANI, N.; KUBO, H.; SHIOMI, M.; KOHDERA, U.; MURAKAMI, T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 35, p.394–399, 2006.

KIM, S.; SUNG, H.; IM, H. J.; HONG, S. J.; KIM, M. N. Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1221–1224, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p.111–120, 1980.

KINGSBURY, D. W. Paramyxoviridae and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fundamental Virology**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1991. p. 507–520.

KONIG, B.; KONIG, W.; ARNOLD, R.; WERCHAU, H.; IHORST, G.; FORSTER, J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 4632–4635, 2004.

KUKAVICA-IBRULJ, I.; BOIVIN, G. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 88-90, 2009.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 5, p.150-163, 2004.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; COREY, L.; MORROW, R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 33, p. 299-305, 2005.

LAHAM, F. R.; ISRAELE, V.; CASELLAS, J. M.; GARCIA, A. M.; LAC PRUGENT, C.; HOFFMAN, S. J.; HAUER, D.; THUMAR, B.; NAME, M. I.; PASCUAL, A.; TARATUTTO, N.; ISHIDA, M. T.; BALDUZZI, M.; MACCARONE, M.; JACKLI, S.; PASSARINO, R.; GAIVIRONSKY, R. A.; KARRON, R. A.; POLACK, N. R.; POLACK, F. P. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p. 2047-2056, 2004.

LAMBERT, S. B.; ALLEN, K. M. Human Metapneumovirus and Human Coronavirus NL63: In Reply. **Pediatrics**, Evanston, v. 121, p. 446-447. 2008.

LANDRY, M. L.; FERGUSON, D.; COHEN, S.; PERET, T. C.; ERDMAN, D. D. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1950-1952, 2005.

LARCHER, C.; GELTNER, C.; FISCHER, H.; NACHBAUR, D.; MULLER, L. C.; HUEMER, H. P. Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, St. Louis, v. 24, n. 11, p. 1891-1901, 2005

LARCHER, C.; PAGANI, E.; ROSSI, P.; AMATO, B.; PESCOLLDERUNGG, L.; CAMPANINI, G.; PERCIVALLE, E.; HUEMER, H. P. Comparison of human metapneumovirus genotypes from the province of Bolzano in northern Italy with strains from surrounding regions in Italy and Austria. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokio, v. 61, n. 2, p. 154-156, 2008.

LEE, W. M.; GRINDLE, K.; PAPPAS, T.; MARSHALL, D. J.; MOSER, M. J.; BEATY, E. L.; SHULT, P. A.; PRUDENT, J. R.; GERN, J. E. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 8, p. 2626-2634, 2007.

LEUNG, J.; ESPER, F.; WEIBEL, C.; KAHN, J. S. Seroepidemiology of Human Metapneumovirus (hMPV) on the Basis of a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Utilizing hMPV Fusion Protein Expressed in Recombinant Vesicular Stomatitis Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 1213-1219, 2005.

LING, R.; DAVIS, P. J.; YU, Q.; WOOD, C. M.; PRINGLE, C. R.; CAVANAGH, D.; EASTON, A. J. Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 36, p. 247–257, 1995.

LIU, L.; BASTIEN, N.; LI, Y. Intracellular Processing, Glycosylation, and Cell Surface Expression of Human Metapneumovirus Attachment Glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 13435–13443, 2007.

LOPEZ-HUERTAS, M. R.; CASAS, I.; ACOSTA-HERRERA, B.; GARCIA, M. L.; COIRAS, M. T.; PEREZ-BRENA, P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 129, p. 1-7, 2005.

LOVATO, L.T.; BRUM, M.C.S.; ALVES, S.H. Viroses respiratórias emergentes: os vírus e seu diagnóstico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 269-173, 2007.

LUDEWICK, H. P.; ABED, Y.; VAN NIEKERK, N.; BOIVIN, G.; KLUGMAN, K. P.; MADHI, S. A. Human metapneumovirus genetic variability, South África. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 7, p. 1074-1078, 2005.

MACKAY, I. M.; JACOB, K. C.; WOOLHOUSE, D.; WALLER, K.; SYRMIS, M. W.; WHILEY, D. M.; SIEBERT, D. J.; NISSEN, M.; SLOOTS, T. P. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n. 1, p. 100-105, 2003.

MACKAY, I. M.; BIALASIEWICZ, S.; WALIUZZAMAN, Z.; CHIDLOW, G. R.; FEGREDO, D. C.; LAINGAM, S. Genotyping of the human metapneumovirus using the P gene identifies four viral subtypes. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, p. 1913–1918, 2004.

MADELEY, C.R.; PEIRIS, J.S.M. Methods in virus diagnosis: Immun- fuorescence revisited. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. 121–134, 2002.

MADHI, S. A.; LUDEWICK, H.; ABED, Y.; KLUGMAN, K. P.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, n. 12, p. 1705-1710, 2003.

MADHI, S. A.; LUDEWICK, H.; KUWANDA, L.; VAN NIEKERK, N.; CUTLAND, C.; KLUGMAN, K. P. Seasonality, incidence, and repeat human metapneumovirus lower respiratory tract infections in an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus type-1 infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 26, p. 693-699, 2007.

MAERTZDORF, J.; WANG, C. K.; BROWN, J. B.; QUINTO, J. D.; CHU, M.; DE GRAAF, M.; VAN DEN HOOGEN, B. G.; SPAETE, R.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 981–986, 2004.

MAGGI, F.; PIFFERI, M.; VATTERONI, M.; FORNAI, C.; TEMPESTINI, E.; ANZILOTTI, S.; LANINI, L.; ANDREOLI, E.; RAGAZZO, V.; PISTELLO, M.; SPECTER, S.; BENDINELLI, M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2987-2991, 2003.

MAHALINGAM, S.; SCHWARZE, J.; ZAID, A.; NISSEN, M.; SLOOTS, T.; TAURO, S.; STORER, J.; ALVAREZ, R.; TRIPP, R. A. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections?. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, p. 285-293, 2006.

MARTINELLO, R. A.; ESPER, F.; WEIBEL, C.; FERGUSON, D.; LANDRY, M. L.; KAHN, J. S. Human metapneumovirus and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Infection**, London, v. 53:248-254, 2006.

MARTINO, R.; PORRAS, R. P.; RABELLA, N.; WILLIAMS, J. V.; RAMILA, E.; MARGALL, N.; LABEAGA, R.; CROWE, J. E., JR.; COLL, P.; SIERRA, J. Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignancies. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 11, p. 781-96, 2005.

MATSUZAKI, Y.; ITAGAKI, T.; ABIKO, C.; AOKI, Y.; SUTO, A.; MIZUTA, K. Clinical impact of human metapneumovirus genotypes and genotype-specific seroprevalence in Yamagata, Japan. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, p. 1084-1089, 2008.

MIRAZO, S.; RUCHANSKY, D.; BLANC, A.; ARBIZA, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 715-718, 2005.

MONTES, M.; VICENTE, D.; ESNAL, O.; CILLA, G.; PEREZ-TRALLERO, E. A PCR–restriction fragment length polymorphism assay to genotype human metapneumovirus. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 14, p. 91-93, 2007.

MONTÓN, C.; TORRES, A.; EL-EBIARY, M.; FILELLA, X.; XAUBET, A.; DE LA BELLACASA, J. P. Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 27, n. 9, p. 1745-1753, 1999.

MULLINS, J. A.; ERDMAN, D. D.; WEINBERG, G. A.; EDWARDS, K.; HALL, C. B.; WALKER, F. J.; IWANE, M.; ANDERSON, L. J. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, p. 700-705, 2004.

MYIAO, C.R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 334 – 344, 1999.

NASCIMENTO J.P; FERREIRA V.; RODRIGUES J. Longitudinal study of agude respiratory diseases in Rio de Janeiro, occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 287 – 296, 1991.

NJENGA, M.K.; LWAMBA, H.M.; SEAL, B.S. Metapneumoviruses in birds and humans. **Virus Research**, Amsterdam, v. 91, p. 163-169, 2003.

OLIVEIRA, R.; MACHADO, A.; TATENO, A.; BOAS, L. V.; PANNUTI, C.; MACHADO, C. Frequency of human metapneumovirus infection in hematopoietic SCT recipients during 3 consecutive years. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 42, n. 4, p. 265-269, 2008.

OLIVEIRA, D. B.; DURIGON, E. L.; CARVALHO, A. C.; LEAL, A. L.; SOUZA, T. S.; THOMAZELLI, L. M.; MORAES, C. T.; VIEIRA, S. E.; GILIO, A. E.; STEWIEN, K. E. Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 81, p. 915 – 921, 2009.

OSTERHAUS, A.; FOUCHIER, R. Human metapneumovirus in the community. **Lancet**, London, v. 361, p. 890–891, 2003.

PEIRIS, J. S.; TANG, W. H.; CHAN, K. H.; KHONG, P. L.; GUAN, Y.; LAU, Y. L.; CHIU, S. S. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, p. 628, 2003.

PELLETIER, G.; DERY, P.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 976–978, 2002.

PERCIVALLE, E.; SARASINI, A.; VISAI, L.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3443-3446, 2005.

PERET, T. C.; BOIVIN, G.; LI, Y.; COUILLARD, M.; HUMPHREY, C.; OSTERHAUS, A. D.; ERDMAN, D. D.; ANDERSON, L. J. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, p. 1660–1663, 2002.

PHAM, Q. N.; BIACCHESI, S.; SKIADOPOULOS, M. H.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L.; BUCHHOLZ, U. J. Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian

metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 15114–15122, 2005

PRINCIPI, N.; BOSIS, S.; ESPÓSITO, S. Human metapneumovirus in paediatric patients. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 12, p. 301-308, 2006.

QUAN, P. L.; PALACIOS, G.; JABADO, O. J.; CONLAN, S.; HIRSCHBERG, D. L.; POZO, F.; JACK, P. J.; CISTERNA, D.; RENWICK, N.; HUI, J.; DRYSDALE, A.; AMOS-RITCHIE, R.; BAUMEISTER, E.; SAVY, V.; LAGER, K. M.; RICHT, J. A.; BOYLE, D. B.; GARCIA-SASTRE, A.; CASAS, I.; PEREZ-BRENA, P.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreenChipResp oligonucleotide Microarray. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, p. 3459-3464, 2007.

RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; TSUCHIYA, L. R.; TAKAHASHI, G. A.; PEREIRA, L. A.; PASQUINI, R.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. **Transplantation**, Baltimore, v. 76. p. 142-146, 2003.

RABONI, S. M.; LEVIS, S.; ROSA, E. S.; BISORDI, I.; DELFRARO, A.; LEMOS, E.; CORREIA, D. C.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Hantavirus Infection in Brazil: Improvement of Detection by the Development and Evaluation of an Enzyme Immunoassay and Immunoblotting Based on Recombinant Protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 58, p. 89-97, 2007.

RAFIEFARD, F.; YUN, Z.; ORVELL, C. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, n. 9, p. 1631-1638.

RAO, B. L.; GANDHE, S. S.; PAWAR, S. D.; ARANKALLE, V. A.; SHAH, S. C.; KINIKAR, A. A. First Detection of Human Metapneumovirus in Children with Acute Respiratory Infection in India: a Preliminary Report. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5961–5962, 2004

RAWLINSON, W. D.; WALIUZZAMAN, Z.; CARTER, I. W.; BELESSIS, Y. C.; GILBERT, K. M.; MORTON, J. R. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection; **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, p. 1314–1318, 2003.

REINA, J.; FERRES, F.; ALCOCEBA, E.; MENA, A.; DE GOPEGUI, E. R.; FIGUEROLA, J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 40, p. 46-49, 2007.

RICCETTO, A. G.; SILVA, L. H.; SPILKI, F. R.; MORCILLO, A. M.; ARNS, C. W.; BARACAT, E. C. Genotypes and Clinical Data of Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus in Brazilian Infants: a new perspective. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 13, p. 35-39, 2009.

SAMRANSAMRUJIT, R.; THANASUGARN, W.; PRAPPHAL, N.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Human metapneumovirus in infants and young children in Thailand with lower respiratory tract infections; molecular characteristics and clinical presentations. **Journal of Infection**, London, v. 52, n. 4, p. 254-263, 2006.

SARASINI, A.; PERCIVALLE, E.; ROVIDA, F.; CAMPANINI, G.; GENINI, E.; TORSELLINI, M.; PAOLUCCI, S.; BALDANTI, F.; MARCHI, A.; GRAZIA REVELLO, M.; GERNA, G. Detection and pathogenicity of human metapneumovirus respiratory infection in pediatric Italian patients during a winter-spring season. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 35, p. 59–68, 2006.

SCHLENDER, J.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; CONZELMANN, K. K.; Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p.4609-4616, 2003.

SCHUTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; ZIEGLER, S.; SIEBERT, C.; KIELISCH, H.; PRALLE, H.; GRIMMINGER, F.; MORR, H.; SEEGER, W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 9, n. 9, p. 1858-1867, 1996.

SEMPLE, M. G.; COWELL, A.; DOVE, W.; GREENSILL, J.; MCNAMARA, P. S.; HALFHIDE, C.; SHEARS, P.; SMYTH, R. L.; HART, C. A. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 3, p. 382-386, 2005.

SHEK, L.P.; LEE, B. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v.4, n. 2, p. 105-111, 2003.

SILVA, L. H. A.; SPILKI, F. R.; RICCETTO, A. G.; DE ALMEIDA, R. S.; BARACAT, E. C.; ARNS, C. W. Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 78-81, 2008.

SKIADOPOULOS, M. H.; BIACCHESI, S.; BUCHHOLZ, U. J.; RIGGS, J. M.; SURMAN, S. R.; AMARO-CARAMBOT, E.; MCAULIFFE, J. M.; ELKINS, W. R.; ST CLAIR, M.; COLLINS, P. L.; MURPHY, B. R. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 6927–6937, 2004.

SLOOTS, T. P.; MACKAY, I. M.; BIALASIEWICZ, S.; JACOB, K. C.; MCQUEEN, E.; HARNETT, G. B.; SIEBERT, D. J.; MASTERS, B. I.; YOUNG, P. R.; NISSEN, M. D. Human metapneumovirus, Australia, 2001-2004. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 8, p. 1263-1266, 2006.

SMITH, E. C.; POPA, A.; CHANG, A.; MASANTE, C.; DUTCH, R. E. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. **The FEBS Journal**, Amsterdam, v. 276, n. 24, p. 7217-7227, 2009.

SOARES, J. A.; BARBOZA, M. A. I.; CROTI, U. A.; FOSS, M. H. D. A.; MOSCARDINI, A. C. Distúrbios respiratórios em crianças com síndrome de Down. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 4, p. 230-233, 2004.

SPIILKI, R.S.; ARNS, C.W. Vírus respiratório sincicial bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 197-214, 2008.

STEMPEL, H. E.; MARTIN, E. T.; KUYPERS, J.; ENGLUND, J. A.; ZERR, D. M. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. **Acta Paediatrica**, Stockholm, v. 98, p. 123-126, 2009.

STOCKTON, J.; STEPHENSON, I.; FLEMING, D.; ZAMBON, M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 897-901, 2002.

SYRMIS, M. W.; WHILEY, D. M.; THOMAS, M.; MACKAY, I. M.; WILLIAMSON, J.; SIEBERT, D. J.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. A Sensitive; Specific; and Cost-Effective Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay for the Detection of Seven Common Respiratory Viruses in Respiratory Samples. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 6, p. 125-131, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANG, R. S.; MAHMOOD, K.; MACPHAIL, M.; GUZZETTA, J. M.; HALLER, A. A.; LIU, H.; KAUR, J.; LAWLOR, H. A.; STILLMAN, E. A.; SCHICKLI, J. H.; FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D.; SPAETE, R. R. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 14, p. 1657-67, 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; OLIVEIRA, D. B.; GOLONO, M. A.; GILLIO, A. E.; STWIEN, K. E.; ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 422-428, 2007.

TSUCHIYA, L. R.; COSTA, L. M.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, southern Brazil. **Journal of Infection**, London, v. 51, p. 401-407, 2005.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; DE JONG, J. C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; DE GROOT, R.; FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine**, New York, v. 7, p. 719-724, 2001.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. **Virology**, New York, v. 295, p. 119-132, 2002.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; VAN DOORNUM, G. J.; FOCKENS, J. C.; CORNELISSEN, J. J.; BEYER, W. E.; DE GROOT, R.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, p. 1571-1577, 2003.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; HERFST, S.; SPRONG, L.; CANE, P. A.; FORLEONETO, E.; DE SWART, R. L.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.10, p. 658-666, 2004a.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; OSTERHAUS, D. M.; FOUCHIER, R. A. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 23, p. S25-S32, 2004b.

VAN DEN HOOGEN, B.G. Respiratory tract infection due to human metapneumovirus among elderly patients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, p. 1159-1160, 2007.

VARGAS, S. O.; KOZAKEWICH, H. P.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; MCADAM, A. J. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. **Pediatric and Development Pathology**, New York, v. 7, p. 478-486, 2004

VIAZOV, S.; RATJEN, F.; SCHEIDHAUER, R.; FIEDLER, M.; ROGGENDORF, M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 3043-3045, 2003.

VICENTE, D.; MONTES, M.; CILLA, G.; PEREZ-YARZA, E. G.; PEREZ-TRALLERO, E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 12, p. e111-e113, 2006.

WALSH, E.E.; PETERSON, D.R.; FALSEY, A.R. Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 168, n. 22, p. 2489-2496, 2008.

WILLIAMS, B. G.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 25-32, 2002.

WILLIAMS, J. V.; HARRIS, P. A.; TOLLEFSON, S. J.; HALBURNT-RUSH, L. L.; PINGSTERHAUS, J. M.; EDWARDS, K. M.; WRIGHT, P. F.; CROWE, J. E., JR. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, p. 443–450, 2004.

WILLIAMS, J. V.; MARTINO, R.; RABELLA, N.; OTEGUI, M.; PARODY, R.; HECK, J. M.; CROWE, J. E., JR. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, p. 1061–1065, 2005a.

WILLIAMS, J. V.; CROWE, J. E., JR.; ENRIQUEZ, R.; MINTON, P.; PEEBLES, R. S., JR.; HAMILTON, R. G.; HIGGINS, S.; GRIFFIN, M.; HARTERT, T. V. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, n. 7, p. 1149-1153, 2005b.

WOLF, D. G.; ZAKAY-RONES, Z.; FADEELA, A.; GREENBERG, D.; DAGAN, R. High Seroprevalence of Human Metapneumovirus among Young Children in Israel. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, p. 1865-1867, 2003.

WYDE, P. R.; MOYLETT, E. H.; CHETTY, S. N.; JEWELL, A.; BOWLIN, T. L.; PIEDRA, P. A. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 63, p. 51–59, 2004.


XEPAPADAKI, P.; PSARRAS, S.; BOSSIOS, A.; TSOLIA, M.; GOURGIOTIS, D.; LIAPI-ADAMIDOU, G.; CONSTANTOPOULOS, A. G.; KAFETZIS, D.; PAPADOPOULOS, N. G. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 30, p. 267–270, 2004.

YANG, C. F.; WANG, C. K.; TOLLEFSON, S. J.; PIYARATNA, R.; LINTAO, L. D.; CHU, M.; LIEM, A.; MARK, M.; SPAETE, R. R.; CROWE, J. E., JR.; WILLIAMS, J. V. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. **Virology Journal**, v. 6, p. 138, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE 1	- Protocolo de RT-PCR para detecção do gene N do hMPV....	144
APÊNDICE 2	- Formulário de coleta de dados clínicos epidemiológicos - Pacientes Pediátricos.....	145
APÊNDICE 3	- Formulário de coleta de dados clínicos epidemiológicos - Pacientes das Unidades de TCTH.....	147
APÊNDICE 4	- Formulário de coleta de dados clínicos epidemiológicos - Pacientes Ambulatoriais.....	149
APÊNDICE 5	- Resultados da subtipagem das amostras positivas para hMPV submetidas ao seqüenciamento genético parcial dos genes N e/ou F.....	150
APÊNDICE 6	- Artigo publicado: “Human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients”	155
APÊNDICE 7	- Artigo enviado para publicação: “Impact of human metapneumovirus infection on hospitalized and outpatients for the years 2006-2008 in southern Brazil” ..	162

APÊNDICE 1

	HOSPITAL DE CLÍNICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SERVIÇO DE ANÁLISES CLÍNICAS
---	---

PROTOCOLO METAPNEUMOVIRUS HUMANO

N	AMOSTRA DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	
11		11		11	
12		12		12	
13		13		13	
14		14		14	

*DNA e RNA extraído em _____
 Método _____
 Técnico _____

* MIX cDNA – Enzima: _____
 Data - _____ Técnico - _____

*PCR realizado em - _____ Técnico - _____
 PCR Master Mix

Reagente	PCR (2,5 µL do cDNA)	
H ₂ O	10,9 µL X _____ =	1 x 94°C – 3' 50 x 94°C – 45" 50°C – 30" 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 10' 4°C - ∞
10x Buffer	2,5 µL X _____ =	
MgCl ₂	0,75 µL X _____ =	
2,5 dntp's	5 µL X _____ =	
Primer hMPV F+ (5pmol/µL)	1µL X _____ =	
Primer hMPV R - (5pmol/µL)	1µL X _____ =	
Primer PRV1+ (10pmol/ µL)	0,5 µL x _____ =	
Primer PRV1- (10pmol/ µL)	0,5 µL x _____ =	
TAQ polimerase	0,35 µL X _____ =	
Volume final	25 µL (22,5 µL MIX + 2,5 µL do cDNA)	

- Analisar em gel de agarose a 1% com Brometo de Etidium.
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H₂O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 *Kb Plus* 10µL (pronto para uso).
- Corrida 100V, por 45'
- Produto Esperado: 928pb

APÊNDICE 2

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS (1/2) PACIENTES PEDIÁTRICOS

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome da criança: _____

Registro HC: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Registro Virologia: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_| Sexo: F |_| M |_| Vivo |_| Morto |_|

Data do nascimento: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|_| Idade: _____

Data do início dos sintomas:

Data da coleta:

|_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|_|

|_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|_|

Data do internamento:

Data da alta médica:

Tempo de internamento:

|_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|_|

|_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|_|

Diagnóstico da infecção Respiratória:

OBS: _____

II - CARACTERÍSTICAS DO RN:

1. **Peso de nascimento** |_|_|_|_|_| kg |_| Desconhecido

2. **Idade gestacional:** |_| Termo |_| Pré-termo |_| Desconhecido

Semanas de gestação: _____

3. **Complicações no período neonatal:** Sim |_| Não |_| Desconhecido |_|

Quais: _____

4. **Uso de TARV no período neonatal:** Sim |_| Não |_| Desconhecido |_|

Droga: _____ Duração: |_| semanas

5. **Aleitamento materno:** Sim |_| Não |_| Desconhecido |_|

Se sim, quanto tempo: _____ Semanas |_| Meses |_|

6. **Testes diagnósticos para o HIV realizados:**

7. **Período total de acompanhamento** da criança até a definição da situação de infecção pelo HIV: _____ Semanas |_| Meses |_|

(2/2)

III - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, EXAMES COMPLEMENTARES E TRATAMENTO:

☐ Anorexia ☐ Apnéia ☐ Cianose ☐ Conjuntivite ☐ Diarréia
☐ Dispnéia ☐ Esforço respiratório ☐ Febre ☐ Gemência
☐ Otite ☐ Rash cutâneo ☐ Respiração sibilosa
☐ Taquipnéia ☐ Tosse ☐ Vômitos

☐ Outros: _____

Frequência cardíaca: _____ Frequência respiratória: _____

Saturação O₂ ar atmosférico: _____

Classificação clínica/imunológica da criança:

Imunocompetente ☐ Imunossuprimido ☐

Presença de fatores de risco:

☐ Prematuridade ☐ Brocodisplasia ☐ Doenças cardíacas ☐ Tabagismo passivo

Unidade de internamento:

☐ UTI ☐ berçário ☐ emergência ☐ clínica pediátrica ☐ outra: _____

Antibioticoterapia: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Broncodilatador: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Corticóide: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Inalação: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Oxigenioterapia: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Respiração assistida: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Rx de tórax: _____

TAC tórax: _____

Hemograma: _____

Gasometria arterial: _____

Hemocultura: _____

Evolução: ☐ cura ☐ óbito

Complicações: _____

(2/2)

III - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, EXAMES COMPLEMENTARES E TRATAMENTO:

☐ Anorexia ☐ Apnéia ☐ Cefaléia ☐ Cianose ☐ Conjuntivite ☐ Coriza
☐ Diarréia ☐ Dispnéia ☐ Esforço respiratório ☐ Faringite ☐ Febre
☐ Gemência ☐ Mialgia ☐ Otite ☐ Rash cutâneo
☐ Respiração sibilosa ☐ Taquipnéia ☐ Tosse ☐ Vômitos
☐ Outros: _____

Antibioticoterapia: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Broncodilatador: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Corticóide: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Inalação: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Oxigenioterapia: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Respiração assistida: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Rx de tórax: _____

TAC tórax: _____

Hemograma: _____

Gasometria arterial: _____

Hemocultura: _____

Evolução: ☐ cura ☐ óbito

Complicações: _____

APÊNDICE 4

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS (1/1) PACIENTES AMBULATORIAIS

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Registro Virologia: ☐☐☐☐☐☐☐☐ Sexo: F ☐ M ☐ Vivo ☐ Morto ☐

Data do nascimento: ☐☐☐-☐☐☐-☐☐☐☐ Idade: _____

Unidade Básica de Saúde: _____

Data do início dos sintomas:

Data da coleta:

☐☐☐-☐☐☐-☐☐☐☐

☐☐☐-☐☐☐-☐☐☐☐

Comorbidades: _____

☐ Prematuridade ☐ Doença Pulmonar ☐ Doenças cardíacas ☐ Tabagismo passivo

II - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, EXAMES COMPLEMENTARES E TRATAMENTO:

☐ Anorexia ☐ Apnéia ☐ Cefaléia ☐ Cianose ☐ Conjuntivite ☐ Coriza

☐ Diarréia ☐ Dispnéia ☐ Esforço respiratório ☐ Faringite ☐ Febre

☐ Gemência ☐ Mialgia ☐ Otite ☐ Rash cutâneo

☐ Respiração sibilosa ☐ Taquipnéia ☐ Tosse ☐ Vômitos

☐ Outros: _____

Antibioticoterapia: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Broncodilatador: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Corticóide: ☐ sim ☐ não tempo: _____ Princ. Ativo: _____

Inalação: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Rx de tórax: _____

Hemograma: _____

Internamento: ☐ sim ☐ não tempo: _____

Diagnóstico da infecção Respiratória:

OBS:

APÊNDICE 5

RESULTADOS DA SUBTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA hMPV SUBMETIDAS AO SEQÜENCIAMENTO GENÉTICO PARCIAL DOS GENES N E/OU F.

Nº amostra	Método Purificação	Quantificação DNA (ng/µL)	Gene seqüenciado	Tamanho da seqüência obtida	Nº Genbank	Subtipagem hMPV
488/06	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 0,54 F: 13,5	F	277 pb	HM124479	A1
1820/06	N: <i>Pure Link</i> TM F: NP	N: 10,32 F: NQ	N	249 pb	HM173093	B2
2387/06	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 79,8	F	423 pb	HM124483	B2
2410/06	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 1,34 F: 11,68	F	347 pb	HM124480	A1
2572/06	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 0,52	F	Nenhuma seqüência obtida		
2665/06	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 0,65 F: 14,17	F	353 pb	HM124481	A1
2681/06	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 21,24 F: NQ	N	366 pb	HM124519	B2
2740/06	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 11,71 F: 16,56	N	297 pb	HM124521	B2
2835/06	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 0,63	F	Nenhuma seqüência obtida		
2885/06	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 3,63 F: 11,03	F	295 pb	HM124482	A1
2894/06	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 33,40 F: NQ	N	364 pb	HM124520	B2
2961/06	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 12,66 F: NQ	N	476 pb	HM124518	A1
3261/06	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 1,69	F	Nenhuma seqüência obtida		

Continua

Continuação

Nº amostra	Método Purificação	Quantificação DNA (ng/µL)	Gene sequenciado	Tamanho da sequência obtida	Nº Genbank	Subtipagem hMPV
3397/06	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: NQ F: 32,3	F	447 pb	HM124484	B2
741/07	N: <i>NucleoSpin</i> ® F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 1,54 F: 10,53	F	250 pb	HM124485	B2
749/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> ™	N: NQ F: 1,32	F	Nenhuma sequência obtida		
751/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: NQ F: 10,68	F	298 pb	HM124486	B2
752/07	N: <i>Pure Link</i> ™ F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 1,26 F: 12,71	F	331 pb	HM124487	B2
1044/07	N: <i>Pure Link</i> ™ F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 2,38 F: 10,83	F	360 pb	HM124488	B2
1053/07	N: <i>NucleoSpin</i> ® F: NP	N: 7,72 F: NQ	N	389 pb	HM124523	B2
1076/07	N: <i>Pure Link</i> ™ F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 2,23 F: 10,37	F	324 pb	HM124489	B2
1174/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> ™	N: NQ F: 1,55	F	Nenhuma sequência obtida		
1198/07	N: <i>Pure Link</i> ™ F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 1,55 F: 8,65	F	320 pb	HM124490	B2
1201/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: NQ F: 4,93	F	412 pb	HM124491	B2
1209/07	N: <i>Pure Link</i> ™ F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 1,29 F: 17,60	F	336 pb	HM124492	B2
1291/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: NQ F: 10,62	F	220 pb	HM124493	B2
1462/07	N: <i>NucleoSpin</i> ® F: <i>NucleoSpin</i> ®	N: 22,07 F: 2,09	N	182 pb	HM173094	B2
1473/07	N: <i>NucleoSpin</i> ® F: NP	N: 22,08 F: NQ	N	196 pb	HM124524	B2

Continua

Continuação

Nº amostra	Método Purificação	Quantificação DNA (ng/µL)	Gene sequenciado	Tamanho da sequência obtida	Nº Genbank	Subtipagem hMPV
1503/07	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 0,97 F: 3,05	F	315 pb	HM124496	B1
1504/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 3,88	F	385 pb	HM124494	B2
1545/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 5,22	F	286 pb	HM124497	B1
1573/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 1,57 F: 4,13	F	239 pb	HM124498	B1
1606/07	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 4,77 F: 12,62	F e N	F: 335 pb N: 367 pb	F: HM124499 N: HM124522	B1
1608/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 11,02	F	287 pb	HM124500	B1
1620/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 8,36	F	251 pb	HM124501	B1
1622/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 9,36	F	287 pb	HM124502	B1
1623/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 10,74	F	330 pb	HM124503	B1
1625/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 0,84	F	Nenhuma sequência obtida		
1626/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 8,97 F: 19,04	F	352 pb	HM124504	B1
1720/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 0,52	F	Nenhuma sequência obtida		
1725/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 0,67	F	Nenhuma sequência obtida		
2400/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 8,97	F	343 pb	HM124505	B1
2562/07	N: NP F: <i>Pure Link</i> TM	N: NQ F: 1,26	F	Nenhuma sequência obtida		

Continua

Continuação

Nº amostra	Método Purificação	Quantificação DNA (ng/µL)	Gene sequenciado	Tamanho da sequência obtida	Nº Genbank	Subtipagem hMPV
2581/07	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 1,15 F: 5,33	F	325 pb	HM124506	B1
2590/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 4,65 F: 9,10	F e N	F: 380 pb N: 213 pb	F: HM124495 N: HM124525	B2
2591/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 8,42 F: NQ	N	302 pb	HM173095	B2
2592/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 25,54 F: NQ	N	364 pb	HM124526	B2
2631/07	N: <i>Pure Link</i> TM F: NP	N: 4,62 F: NQ	N	354 pb	HM173096	B2
2632/07	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 7,34	F	366 pb	HM124507	B1
2633/07	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: NP	N: 12,48 F: NQ	N	215 pb	HM124527	B2
2987/07	N: <i>Pure Link</i> TM F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 2,67 F: 11,32	F	351 pb	HM124508	B1
161/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 16,72	F	229 pb	HM124509	A2a
163/08	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 2,59 F: 16,72	F	296 pb	HM124510	A2a
171/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 14,97	F	446 pb	HM124511	A2a
175/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 15,41	F	433 pb	HM124512	A2a
836/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 10,42	F	392 pb	HM124513	A2a
967/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 15,99	F	290 pb	HM124514	A2a
1000/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 22,83	F	320 pb	HM124516	A2a

Continua

Nº amostra	Método Purificação	Quantificação DNA (ng/µL)	Gene sequenciado	Tamanho da sequência obtida	Conclusão	
					Nº Genbank	Subtipagem hMPV
1113/08	N: <i>NucleoSpin</i> [®] F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: 9,83 F: 17,57	F e N	F: 275 pb N: 341 pb	F: HM124517 N: HM124528	A2a
2311/08	N: NP F: <i>NucleoSpin</i> [®]	N: NQ F: 27,10	F	341 pb	HM124515	A2a
3124/08	N: NP F: <i>Pure Link</i> [™]	N: NQ F: 2,38	F	Nenhuma sequência obtida		

FONTE: O autor (2010)

NOTA: N: produto de PCR para o gene N.

F: produto de PCR do gene F.

NP: O produto de PCR não foi purificado.

NQ: Não foi realizada a quantificação do produto purificado.

Pure Link[™]: Os fragmentos de DNA do tamanho esperado foram cortados do gel de agarose, extraídos e purificados com o *Pure Link*[™] Quick gel Extraction kit.

NucleoSpin[®]: Os produtos de PCR foram purificados diretamente com o *NucleoSpin*[®] Extract II kit.

APÊNDICE 6

ARTIGO PUBLICADO

© 2009 John Wiley & Sons A/S

Transplant Infectious Disease . ISSN 1398-2273

Short communication

Human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients

M.C. Debur, L.R. Vidal, E. Stroparo, M.B. Nogueira, S.M. Almeida, G.A. Takahashi, I. Rotta, L.A. Pereira, C.S. Silveira, C.M. Bonfim, S.M. Raboni. Human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients.

Transpl Infect Dis 2010; 12: 173–179. All rights reserved

Abstract: Human metapneumovirus (hMPV) was described in 2001 and has been associated with both upper and lower respiratory tract infection (URTI and LRTI, respectively), especially in children, the elderly, and in immunocompromised patients. The objective of this study was to identify hMPV as the etiological agent of acute respiratory infection in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients and to determine the clinical features of hMPV infection in these patients.

Methods. The study was performed retrospectively in 769 respiratory samples obtained from immunocompromised patients submitted to HSCT over a period of 6 years. RNA was extracted by the guanidinium thiocyanate method, and reverse transcription polymerase chain reaction assay was performed to amplify a 928pb fragment of the hMPV N gene.

Results. hMPV was present in 19 (2.5%) samples. The mean age of infected patients was 18.3 ± 10.8 (range, 3–41). Sixty-six percent of hMPV infections occurred during autumn, winter, and spring months. Three episodes showed co-infection with more than 1 virus. Two patients (11.1%) were infected a few days into the conditioning period and 9 (50%) in the first 3 months after the transplant. The majority of patients (72.2%) presented URTI alone with flu-like symptoms (cough, fever, headache, wheezing), while 5 patients (27.8%) had LRTI (pneumonia). No patient died from complications associated with the hMPV infection.

Conclusions. hMPV has been reported as a respiratory pathogen in HSCT patients. We suggest that hMPV infection should be routinely investigated in this population, mainly in children, to prevent nosocomial transmission during transplant proceedings and to avoid the risk of progressing to complications due to LRTI.

M.C. Debur¹, L.R. Vidal¹, E. Stroparo¹, M.B. Nogueira¹, S.M. Almeida¹, G.A. Takahashi¹, I. Rotta¹, L.A. Pereira¹, C.S. Silveira¹, C.M. Bonfim², S.M. Raboni¹

¹Laboratory of Virology and ²Bone Marrow Transplant Unit, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

Key words: human metapneumovirus; respiratory infection; immunocompromised patients; hematopoietic stem cell transplant

Correspondence to:

Dr Sonia Mara Raboni, Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas, UFPR, Rua Padre Camargo, 280, 2^o andar, Sala 202, CEP 82060-240 Alto da XV, Curitiba-PR, Brazil

Tel: 55 41 3360 7974

Fax: 55 41 3360 1811

E-mail: virologiahc@ufpr.br

Received 13 May 2009, revised 22 July 2009, accepted for publication 30 July 2009

DOI: 10.1111/j.1399-3062.2009.00465.x

Transpl Infect Dis 2010; 12: 173–179

Worldwide, respiratory virus infections are related to acute diseases that affect all age groups, with significant morbidity and mortality (1, 2). Recipients of solid organ or hematopoietic stem cell transplant (HSCT) are at increased risk for these infections (3).

Advances in molecular techniques enabled the discovery of new human respiratory viruses (4). In 2001, van den Hoogen et al. (5) described the human metapneumovirus (hMPV), which has since been associated with both upper respiratory tract infection (URTI) and lower respiratory tract infection (LRTI), mainly in children, the elderly, and in immunocompromised patients (6–9).

Previously, reports involving HSCT recipients show that the incidence of hMPV infection is about 5%, and 3% in allogeneic and autologous HSCT recipients, respectively (3, 9, 10). The majority of hMPV-infected patients presented URTI alone, but a significant proportion progressed to LRTI (9). It has been suggested that hMPV may be the causative agent of some cases previously categorized as idiopathic pneumonia syndrome (11, 12), sometimes involving fatal pneumonia (9, 12–15).

As previous studies reported, hMPV infection in HSCT recipients is important and needs to be investigated. Thus, the objective of this study was to identify hMPV as

the etiological agent of acute respiratory infection in HSCT patients and to determine the clinical features of this infection. These results would improve our understanding of the epidemiology and advance the management of hMPV infection among transplant recipients.

Material and methods

Samples

All immunocompromised patient submitted to HSCT from Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), in Curitiba, Paraná state, Brazil, with symptoms of URTI or LRTI, underwent collection of nasopharyngeal aspirate or bronchoalveolar lavage to investigate the presence of the most common viruses in our region.

After the collection, respiratory samples were maintained in viral transport medium (tryptose buffer enriched with gelatin) and transported on ice to the virology laboratory. The samples were processed by indirect immunofluorescence assay using commercially available monoclonal antibodies (Chemicon International Inc., Temecula, California, USA) to detect the most common viral antigens, such as respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A (FLUA), influenza virus B (FLUB), adenovirus (AdV), and parainfluenza virus (PIV) (16). Sample aliquots in transport medium were stored at -70°C for future detection of hMPV by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay.

This study was performed retrospectively in 769 respiratory samples obtained from immunocompromised patients over a period of 6 years (2000–2002 and 2006–2008).

This study was approved by Ethical Committee for Human Beings from UFPR (process number: 00350.208.000-06).

Detection of N gene of hMPV

Samples containing 1 mL of viral transport medium were kept at -70°C until they were used for RNA extraction. Total RNA was extracted using guanidinium thiocyanate as previously described (17). Five hundred copies of pseudo rabies virus (PRV) was added to the extraction buffer as internal control. Complementary DNA (cDNA) was produced using the Superscript II RT enzyme (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and the specific N1 primer (5'-ATGGGGACAAGTGAAAATGTC-3') by incubation for 60 min at 42°C . Amplification was performed to detect a 928 bp conserved region of the nucleoprotein (N) gene (positions 112–1040 nt, based on GenBank AY297749 sequence). Two microliters of cDNA were used for a 25 μL reaction containing the following: 2.5 μL 10x PCR buffer minus

Mg (Invitrogen, Life Technologies), 0.75 μL of 50 mM MgCl_2 (Invitrogen, Life Technologies), 5 μL of 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of PRV1- (5'-ATGACGCCGATGTACTTCTTCTT-3'), 10 pmol of PRV1+ (5'-CGCGTGGTCTACGGGGACACGGA-3'), 5 pmol of N2 (5'-GAGTCTCAGTACACAATAA-3'), 5 pmol of N3 (5'-GCATTTCGAGACAACAC-3') primers (18), 1.25 U of Taq Polymerase (Invitrogen, Life Technologies), and completed with RNase-free distilled water. Cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 min was followed by 50 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. PCR reactions included water as negative control and a positive control generated in our laboratory as described by Debur et al. (19). RT-PCR was performed in duplicate and samples were considered positive if they were positive in both reactions.

URTI and LRTI definitions

URTI was defined as new onset of nasal, pharyngeal, or laryngeal irritation. LRTI was defined as cough, rales, and/or wheezing in conjunction with a new pulmonary infiltrate identified by chest radiograph. Progression of URTI to LRTI was defined as the development of pneumonia in patients with prior or concurrent URTI.

Results

RT-PCR assay for detection of the hMPV N gene was performed in all 769 respiratory samples enrolled in our study. In 189 patients, 19 (2.5%) positive samples to hMPV infection were observed. One patient was found positive in 2 different months of the same year (May and June 2002). The incidence of hMPV infection in immunocompromised patients submitted to HSCT at HC-UFPR was 3.7%.

Table 1 shows hMPV incidence in immunocompromised patients per year. In the majority of the hMPV detected samples (16/19 – 84.2%), this virus was the only pathogen found. Co-infection with other viruses was observed in 3 samples. Two patients were co-infected with PIV/hMPV and 1 patient with hMPV/RSV/FLUA. Two of these patients (2/3 – 66.7%) had LRTI (pneumonia). Others viruses, such as RSV, PIV, FLUA, FLUB, and AdV have also been detected in the period of the study, and probably were the etiologic agent of 21.7% of respiratory infections, as showed in Table 1. In the majority of the analyzed samples (580/769 – 75.4%) no virus was detected. Among 11 positive cases of hMPV in the first 3 years of the study (2000–2002), 9

Results of human metapneumovirus (hMPV) detection in immunocompromised patients submitted to hematopoietic stem cell transplant (HSCT) from Curitiba, Paraná State, Brazil

HSCT patients						
Virus, year, no.	2000 (n = 110)	2001 (n = 143)	2002 (n = 160)	2006 (n = 119)	2007 (n = 127)	2008 (n = 110)
hMPV	1 (0.9%)	4 (2.8%)	4 (2.5%)	4 (3.4%)	3 (2.4%)	0 (0.0%)
Co-infection ¹	1 ² (0.9%)	0 (0.0%)	1 ³ (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 ² (0.9%)
Other viruses ⁴	31 (28.2%)	34 (23.8%)	25 (15.6%)	21 (17.6%)	30 (23.6%)	26 (23.6%)
Negative	77 (70.0%)	103 (72.0%)	129 (80.6%)	94 (79.0%)	94 (74.0%)	83 (75.4%)
Total (n = 769)						

¹Co-infection was determined using results of immunofluorescence (IF) assay.

²hMPV/PIV.

³hMPV/RSV/FLUA.

⁴Infections by other viruses were determined using IF assay, which was used to investigate the most common viral antigens in our region. The viruses detected were: respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A (FLUA), influenza virus B, adenovirus, and parainfluenza virus (PIV).

Table 1

(81.8%) were observed in 2 consecutive years (2001/2002), and for the 8 positive cases detected with hMPV between the years 2006–2008, 7 (87.5%) were also observed in 2 consecutive years (2006/2007).

Figure 1 shows the distribution of hMPV-positive samples from 2000 to 2002 and from 2006 to 2008. Although hMPV circulated throughout the year, we found positive samples mainly in autumn and spring for the years 2000–2002 and winter and spring for the years 2006–2008.

The mean age of the immunocompromised patients infected with hMPV was 18.3 ± 10.8 (range, 3–41); there was no difference in distribution between genders. Among the hMPV-infected patients, 6 (6/18 – 33.3%) had the infection before HSCT and 12 (12/18 – 66.7%) after HSCT.

Table 2 describes some of the characteristics of the immunocompromised patients infected with hMPV before the transplant. Six patients (6/18 – 33.3%) had hMPV infection before the transplant and one of them (number 5 – Table 2), who was under steroid treatment/regimen (pred-

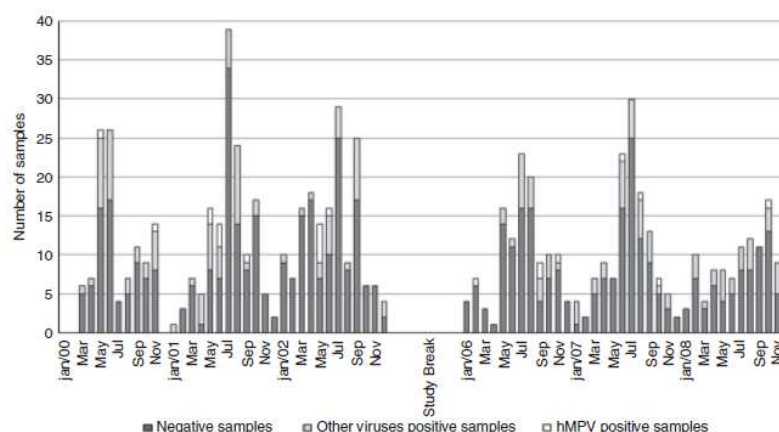


Fig. 1. Seasonal distribution of human metapneumovirus (hMPV) in the period of the study. The graph shows the results of virus detection in the samples analyzed in the 2 periods of the study (2000–2002 and 2006–2008). White blocks refer to hMPV detection, which includes the cases of co-infections with other viruses. Light gray blocks refer to other viruses detected in the period of the study by immunofluorescence assay, which were respiratory syncytial virus, influenza virus A, influenza virus B, adenovirus, and parainfluenza virus. Dark gray blocks represent samples with no virus detection (negative samples).

Characteristics of immunocompromised patients infected with human metapneumovirus (hMPV) before hematopoietic stem cell transplant (HSCT)

Patients ¹	Characteristics			Detection of hMPV infection	
	Age (years)	Gender	Underlying disease	Period relative to HSCT (days) ²	Season/year
1	13	M	ALD	-24	Autumn/2000
2	19	F	SAA	-12	Winter/2001
3	17	M	SAA	-100	Autumn/2001
4	41	M	SAA	-57	Winter/2001
5	37	M	PNH	³	Autumn/2002
6	9	M	ALL	-14	Spring/2006

¹Each patient infected with hMPV was sequentially numbered according to the year of detection.

²The day of HSCT was considered day 0.

³This patient was not submitted to HSCT at that time.

M, male; ALD, adrenoleukodystrophy; F, female; SAA, severe aplastic anemia; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Table 2

nisone), had LRTI (pneumonia). Two other patients (2/18 – 11.11%) had the infection a few days before the initiation of the conditioning period, but they had no respiratory complication because of this infection.

Table 3 describes some of the characteristics of the HSCT patients infected with hMPV after the transplant. The mean age of these patients was 12.5 ± 9.8 (range, 3–30). Among the 12 hMPV-infected patients after the transplant, 9 (9/12 – 75.0%) were infected in the first 100 days of HSCT and the majority were younger than 12 years old (6/9 – 75%). Although the present study included samples of HSCT patients submitted to autologous and allogeneic transplant, hMPV infection was detected only in allogeneic transplanted patients. Eight patients (8/12 – 66.7%) received transplants from a related donor while 4 (4/12 – 33.3%) had unrelated donors. Nine patients (9/12 – 75.0%) had the infection in the first 3 months after the transplant and in 1 of them (Patient 5 in Table 3) the virus continued to be detected for 16 days. Among these patients, Patients 4, 5, 10, and 12 (Table 3) had LRTI (pneumonia). Three patients (3/12 – 25.0%) had hMPV infection 8 months after the transplant.

The clinical symptoms of hMPV infection are described in Table 4. Patients who had hMPV infection 8 months after the transplant were excluded from this data set because they were only mildly symptomatic. Symptoms more frequently reported were wheeze (93.3%), cough (93.3%), fever (53.3%), and headache (33.3%).

The majority of patients (13/18 – 72.2%) presented URTI alone. Five patients (5/18 – 27.8%) had lower respiratory complication with interstitial infiltrates as observed in a radiologic evaluation. Two of them were younger than age 5

years. Seventy-five percent of these patients (3/4 – 75%) were transplanted from unrelated donors.

Patients who had hMPV infection in the period after the transplant received symptomatic treatment at home. The patients with LRTI (pneumonia) were hospitalized for a median of 2 days (range 1–35 days) and were treated with supplemental oxygen, steroids, antibiotics, and bronchodilators. One patient required mechanical ventilation. The patient follow-up was done in the out patient clinic. No patient died.

Discussion

hMPV is an emerging respiratory virus commonly reported worldwide (20). In our study, all patients who had hMPV infection after the transplant were infected after discharged from the HSCT isolation unit. These patients stay close to the hospital until day +100 after transplant and they usually come to the hospital daily to receive drugs. Only 3 patients were infected in the first 30 days after HSCT, a period when the patient undergoes the most intense immunosuppression and thus is more prone to infection. Six other patients were infected between day 30 and day 90 after HSCT. It is possible that these infections were due to contact with infected patients in the hospital, to other infected people in their communities, or because they were more exposed to circulating viral agents (21).

In the majority of hMPV infections detected in our study, this virus was the only pathogen found (Table 1), which suggests that it was responsible for the respiratory illness

Characteristics of human metapneumovirus (hMPV) infected patients after hematopoietic stem cell transplant (HSCT)

Patients ¹	Characteristics					Detection of hMPV infection	
	Age (years)	Gender	Underlying disease	HSCT type donor (allogeneic transplant/stem cell source)	Pre-transplant conditioning (C) and GVHD prophylaxis (P)	Period relative to HSCT (days) ²	Season/year
1 ³	27	F	CML	Related/bone marrow	C: BUS + CY P: CsA + MTX	+ 349	Spring/2000
2	30	M	CML	Unrelated/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 348	Winter/2001
3	30	F	SAA	Related/bone marrow	C: BUS + CY P: CsA + MTX	+ 253	Autumn/2002
4 ⁴	5	F	ALL	Related/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 66	Autumn/2002
5	18	M	ALL	Unrelated/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 25	Autumn/2002
6	10	F	AML	Related/bone marrow	C: BUS + CY P: CsA + MTX	+ 30	Summer/2006
7	14	F	ALL	Related/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 61	Spring/2006
8	11	M	ALL	Related/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 49	Spring/2006
9	26	F	NHL	Related/peripheral blood	C: CY + Flu P: CsA + MTX	+ 69	Winter/2007
10	3	M	WAS	Unrelated/cord blood	C: BUS + CY P: CsA + MTX	+ 79	Winter/2007
11	9	F	ALL	Related/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 19	Spring/2007
12 ³	10	F	ALL	Unrelated/bone marrow	C: CY + TBI P: CsA + MTX	+ 56	Spring/2008

¹Each patient infected with hMPV was sequentially numbered according to the year of detection.
²The day of HSCT was considered day 0.
³Patient co-infected with parainfluenza virus/hMPV.
⁴Patient co-infected with hMPV/respiratory syncytial virus/influenza A.
 GVHD, graft-versus-host disease; F, female; CML, chronic myelogenous leukemia; BUS, busulfan; CY, cyclophosphamide; CsA, cyclosporine; M, male; MTX, methotrexate; TBI, total body irradiation; SAA, severe aplastic anemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; NHL, non-Hodgkin lymphoma; Flu, fludarabine phosphate; WAS, Wiskott-Aldrich syndrome.

Table 3

by itself. Generally, secondary infections by bacteria or virus are relatively common after viral URTI or LRTI, although there is a debate about true primary and secondary infection (22). Co-infections usually lead to LRTI (23). Significantly, we found co-infections of hMPV with PIV, RSV, FLUA, and FLUB, which can lead to pneumonia (9). Tsuchiya et al. (24), in a study with the same HSCT patients during the period of 2000–2003, found that RSV and PIV were the more frequent viruses circulated between these patients. Therefore, such co-infections could be explained because these viruses circulate in the same period of the year.

The patients in our study had different underlying diseases and degrees of immunosuppression, which suggests

that severe immune compromise is not a necessary risk factor for hMPV infections (9), but the condition of immunosuppression *per se* is a risk factor to respiratory disease (25) and so is hMPV infection.

In the present study, the majority of hMPV-infected patients presented URTI alone, with cough and wheeze as initial symptoms, as previously reported (12, 26). These symptoms at this stage are usually resolved only by symptomatic treatment. However, a total of 27.8% of the patients progressed to LRTI. Among the patients who progressed to LRTI only due to the hMPV infection, 1 of them had the infection near the conditioning period (recent use of high dose of corticosteroids) and another in the first 100 days after the transplant.

Clinical symptoms of patients with human metapneumovirus (hMPV) infection

Clinical manifestation ¹	Patients number (%), n = 15
Cough	14 (93.3%)
Wheeze	14 (93.3%)
Fever	8 (53.3%)
Headache	5 (33.3%)
Dyspnea	3 (20%)
Otalgia	3 (20%)
Vomiting	1 (6.7%)
Myalgia	1 (6.7%)
Hyporexia	1 (6.7%)
Pneumonia	5 (33.3%)

¹Patients had more than one symptom.**Table 4**

Since its description in 2001, hMPV has been found in all age groups with worldwide circulation and universal immunity by age 5 (18, 27–29). Reinfection with hMPV occurs throughout adult life and has been diagnosed in 1–9% of adults each year by RT-PCR or serology (28). The mean age of the patients of our study was 18.3 (range 3–41). Among the patients who had LRTI, 2 were <5 years old. The risk of pneumonia in young HSCT patients might be a result of the primary infection or immature immunologic response. Among the adults, HSCT patients were probably infected in the first 30 days after HSCT because immunosuppression facilitates respiratory infection. Alternatively, patients could be infected by another subgroup of hMPV for which they do not yet have antibodies (11, 26). It is important to point out that among the 4 patients who had LRTI, 3 (75%) had unrelated donors. Only 1 patient with LRTI was not lymphocytopenic (data not shown), which is in agreement with the hypothesis that lymphocytopenia is a significant variable predisposing to LRTI by respiratory viruses, such as hMPV (10).

The incidence of hMPV in immunocompromised patients submitted to HSCT at HC-UFPR was 3.7% and it was detected only in allogeneic transplant patients. Incidence estimates of hMPV infection in HSCT patients vary widely over the transplantation regimen and the type of surveillance adopted (3). Martino and collaborators (10) reported an incidence of 5.2% and 2.9% in allogeneic and autologous HSCT patients. Oliveira and collaborators (15), in a study of 3 consecutive years, found an incidence of 5.9% and 1.3% in allogeneic and autologous HSCT patients, respectively. Furthermore, the authors describe the death of 1 patient with allogeneic HSCT co-infected with FLUB. Williams and collaborators (9) conducted a 4-year

study and hMPV was detected in 3.6% and 2.8% of the samples from allogeneic and autologous HSCT patients, respectively. Thus, respiratory infections, mainly in allogeneic HSCT patients, must be investigated to avoid progress to LRTI.

The hMPV circulated during autumn, winter, and spring months, and it was correlated with lower temperatures (mean 15°C/59°F, 12.8°C/55°F, 15°C/59°F, respectively). This seasonal relationship was already described in a previous study by the same group (19). In the current study, hMPV was mainly detected in 2 consecutive years as observed in Fig. 1 (2000–2001 and 2006–2007). Similar data were described by Martino et al. (10), who studied respiratory viruses during 4 years (1999–2003) and found a 2-year incidence of hMPV infection.

Exact comparisons between the incidence of hMPV and other viruses in this study are difficult to make because hMPV was detected by a sensitive molecular technique, whereas other viruses were detected by indirect immunofluorescence assay (30). We believe that the detection of coinfections and incidence of others viruses could be underestimated.

It is interesting to point out that in 19 (2.5%) patients, previously virus-negative respiratory infection in immunocompromised patients were attributable to hMPV. Three patients had pneumonia, probably due to this virus infection because it was the only pathogen found. Although this is a brief report and only reported 12 cases of hMPV infection after HSCT, it is noteworthy that this virus was detected in immunocompromised patients in different bone marrow transplant procedures of all age groups, although 50% of these patients were children <14 years of age. These infections were diagnosed retrospectively, so no hMPV-specific therapeutic intervention was used. In this study, there were no deaths. More prospective studies are necessary to address this issue.

Our results suggest that the introduction of nucleic acid-based techniques to identify emerging respiratory viruses such as hMPV, particularly in immunocompromised patients, should be routinely performed to prevent nosocomial transmission during transplant proceedings and to avoid the risk of progression to complications due to LRTI.

References

1. Coyle PV, Ong GM, O'Neill HJ, et al. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute respiratory tract infections. *BMC Microbiol* 2004; 4: 41–49.
2. Shek LP, Lee B. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infection in the tropics. *Pediatr Res* 2003; 4: 105–111.

3. Peck AJ. Respiratory virus infection among hematopoietic cell transplant recipients: evidence for asymptomatic parainfluenza virus infection. *Blood* 2007; 110 (5): 1681–1688.
4. Anderson EJ. Viral diagnostics and antiviral therapy in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des* 2008; 14 (20): 1997–2010.
5. van den Hoogen BG, Jong CJ, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7 (6): 719–724.
6. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350: 443–450.
7. Boivin G, De Serres G, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9 (6): 634–640.
8. Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 518–524.
9. Williams JV, Martino R, Rabella N. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. *J Infect Dis* 2005; 192 (6): 1061–1065.
10. Martino R, Parody RP, Rabella N, et al. Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 781–796.
11. Boeckh M, Erard V, Zerr D, Englund J. Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2005; 9 (7): 48–54.
12. Englund JA, Boeckh M, Kuypers J, et al. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med* 2006; 144 (5): 344–349.
13. Pelletier G, D  ry P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (9): 976–978.
14. Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, Osterhaus ADME. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 309–310.
15. Oliveira RR, Machado AF, Tateno AF, Vilas Boas LS, Pannuti CS, Machado CM. Frequency of human metapneumovirus infection in hematopoietic SCT recipients during 3 consecutive years. *Bone Marrow Transplant* 2008; 00: 1–5.
16. Gardner PS, MacQuillin J. Viral diagnosis by immunofluorescence. *Lancet* 1968; 1 (7542): 597.
17. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995; 53: 25–36.
18. Mirazo S, Ruchansky D, Blanc A, et al. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 715–718.
19. Debur MC, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007; 39 (1): 59–62.
20. Kahn KS. Newly discovery respiratory viruses: significance and implication. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 478–483.
21. Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, et al. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. *Transplantation* 2003; 76 (1): 142–146.
22. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004; 113 (4): 701–707.
23. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24 (7): 605–610.
24. Tsuchiya LRRV, Costa LMD, Raboni SM, et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect* 2005; 51 (5): 401–407.
25. Couch RB, Englund JA, Whimbey E. Respiratory viral infection in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am J Med* 1997; 102 (3A): 2–9.
26. Lee I, Barton TD. Viral respiratory tract infections in transplant patients: epidemiology, recognition and management. *Drugs* 2007; 67 (10): 1411–1427.
27. Dare R, Sanghavi S, Bullotta A, et al. diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (2): 548–552.
28. Falsey AR. Human metapneumovirus infection in adults. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27 (10, Suppl): S80–S83.
29. Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (3): 1213–1219.
30. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2009; 98 (1): 123–126.

APÊNDICE 7**ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

Running Title: hMPV in hospitalized and outpatients

**IMPACT OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS INFECTION ON HOSPITALIZED
AND OUTPATIENTS FOR THE YEARS 2006-2008 IN SOUTHERN BRAZIL**

Maria C. Debur¹, Luine R.R. Vidal¹, Elenice Stroparo¹, Meri B. Nogueira¹, Sérgio M. Almeida¹, Gislene A. Takahashi¹, Indianara Rotta¹, Luciane A. Pereira¹, Clyete S. Silveira¹, Adriana Delfraro², Sueli M. Nakatani³, Irene Skraba³, Sonia M. Raboni^{1,4/+}

¹ Laboratory of Virology, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

² Carlos Chagas Institute (ICC/Fiocruz Paraná), Curitiba, Brazil.

³ Central Laboratory of Public Health of Paraná state, Curitiba, Brazil.

⁴ Infectious Disease Discipline, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁺Corresponding author:

Dr. Sonia Mara Raboni

Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas, UFPR

Rua Padre Camargo, 280, 2º andar, Sala 202

CEP: 82060-240 Alto da XV, Curitiba-PR, Brazil

Phone: 55 41 3360-7974 FAX: 55 41 3360-1811

E-mail: virologiahc@ufpr.br or sraboni@ufpr.br

ABSTRACT

The human metapneumovirus (hMPV), member of the *Paramyxoviridae* family, has been reported as an important agent involved with acute respiratory infections (ARI). The present study was aimed to identify hMPV as the etiological agent of ARI in hospitalized and outpatients in Curitiba city, Southern Brazil and describe clinical data of hMPV subtyping. A retrospective study was performed in 1,572 respiratory samples over a period of three years. hMPV was detected by RT-PCR and subtyping was performed by nucleotide sequencing. hMPV was present in 61 (3.9%) samples and subtypes A1, A2a, B1 and B2 were detected. The incidence of hMPV was higher in outpatients (5.9%), whose median age was 8.3 years (range 6 months to 75 years old), than in inpatients (3.0%), whose median age was 7.6 months (range 1 month to 26 years old). The outpatients had upper respiratory tract infection with flu like symptoms and all hospitalized children had lower respiratory tract infection. A pediatric patient died from complications associated with hMPV A2a infection. hMPV has been reported as a respiratory pathogen in all age groups. No correlation was observed between viral subtype and disease severity in the samples of this study.

KEY WORDS: human metapneumovirus, subtypes, respiratory infection, hospitalized patients, outpatients.

INTRODUCTION

Acute respiratory tract infections (ARI) are an important cause of morbidity and mortality in the world (Alto 2004, Kahn 2006). Nowadays, in Brazil and other countries, viruses have been frequently reported as etiologic agents of ARI (Alto 2004, Costa *et al.* 2006, Tsuchiya *et al.* 2005). Tsuchiya *et al.* (2005), in a study in Curitiba, Paraná state, Southern Brazil, identified the most common respiratory viruses (Influenza A [FLU A], Influenza B [FLU B], respiratory syncytial virus [RSV], adenoviruses [AdV], human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 [PIV1, 2 and 3]) as etiological agents in 30% of the specimens of respiratory tract infection in outpatients and hospitalized patients. However, in a great number of ARI the etiological agent is not determined (Thomazelli *et al.* 2007, Tsuchiya *et al.* 2005).

Advances in epidemiologic surveillance and molecular biology have allowed the rapid recognition and identification of several newly emerging respiratory pathogens (Alto 2004, Kahn 2006). The human metapneumovirus (hMPV) was first described in 2001, in the Netherlands, and was classified in *Paramyxoviridae* family (van den Hoogen *et al.* 2001). Sequence analysis of isolates identified two main genotypes of hMPV, A and B, with the subtypes A1, A2a, A2b, B1 and B2 (Gray *et al.* 2006, Huck *et al.* 2006).

hMPV has been associated with respiratory disease in several countries throughout the world (Bastien *et al.* 2003, Cuevas *et al.* 2003, Debur *et al.* 2007, Ebihara *et al.* 2004, Esper *et al.* 2003, Freymouth *et al.* 2003, Gray *et al.* 2006, Howe 2002, Madhi *et al.* 2003, Maggi *et al.* 2003, Mirazo *et al.* 2005, Peiris *et al.* 2003). The epidemiological characteristics of hMPV infection include respiratory impairment, particularly in children, elderly and immunocompromised patients (van den Hoogen

et al. 2004) with clinical symptoms that cannot be distinguished from those associated with other respiratory virus diseases, and may cause from upper respiratory tract infection to bronchiolitis and pneumonia (Boivin *et al.* 2002). Common laboratory methods for diagnosis of respiratory viruses, such as tissue culture and antigen-based assay, have shown low sensitivity and specificity to detect hMPV, whereas molecular assay, RT-PCR, was the first method selected to detect this virus (Calico *et al.* 2009, Mackay *et al.* 2003).

This study was aimed to present demographic and clinical data from inpatients and outpatients with respiratory infections caused by hMPV subtypes.

MATERIAL AND METHODS

SAMPLES

We have analyzed nasopharyngeal aspirates (NPA) from patients with respiratory clinical manifestation admitted to the Teaching Hospital of the Federal University of Paraná (HC-UFPR) and in primary healthcare units that were included in the National Influenza Protocol (Influenza Surveillance Program), in Curitiba, State of Paraná, in southern Brazil, in the period of 2006 to 2008.

The study samples from the hospitalized patients of HC-UFPR were obtained from those admitted to different clinical units, such as the Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) and Pediatrics (semi-intensive and intensive care) units to treat acute respiratory tract infections. The samples from outpatients were obtained from those assisted in the primary health care units and included in the National Influenza Protocol with 'flu-like' clinical manifestations (fever, cough, wheeze, dyspnea, otalgia, myalgia) and the three selection criteria were fever, at least one of the respiratory manifestations and one clinical manifestation.

The NPA were obtained by aspiration, as described by Gardner and McQuillin (1968). The samples were maintained in a transport medium (Tryptose phosphate buffer enriched with gelatin) and transported on ice to the virology laboratory. The NPA samples were processed to detect the most common viral antigens, such as RSV, FLUA, FLUB, AdV and PIV, by indirect immunofluorescence assay (IFA) as previously described (Cox *et al.* 1998), using commercially available monoclonal antibodies (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Aliquots of the sample in transport medium were stored at -70°C for RT-PCR assay to detect hMPV.

DETECTION OF hMPV N GENE

Samples added to 1 mL of viral transport medium kept at -70°C were used for RNA extraction. Total RNA was extracted using the buffer containing guanidine thiocyanate as previously described (Casas *et al.* 1995). Five hundred copies of pseudorabies virus (PRV) were added to the extraction buffer as internal control. Complementary DNA (cDNA) was produced using specific N1 primer (5' - ATGGGGACAAGTGAAAATGTC - 3') and the Superscript II RT enzyme (Invitrogen, Life Technologies), incubated for 60 min at 42°C , accordingly to manufacturer's instructions. cDNA was amplified to detect a 928bp conserved region of nucleoprotein (N) gene (positions 112–1040nt, based on AY297749 sequence). Two microliters of cDNA were used for a 25 μL reaction containing the following: 2.5 μL 10x PCR buffer minus Mg (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 0.75 μL of 50 mM MgCl_2 (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 5 μL of 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of PRV1- (5' - ATGACGCCGATGTACTTCTTCTT - 3'), 10 pmol of PRV1+ (5' - CGCGTGGTCTACGGGGACACGGA - 3'), 5 pmol of N2 (5' - GAGTCTCAGTACACAATAA - 3'), 5 pmol of N3 (5' - GCATTTCCGAGAACAACAC - 3') primers,²¹ 1.25 U of Taq Polymerase (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA) and completed with RNase free distilled water. Cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 50 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (modified from Mirazo *et al.*, 2005). For reference and quality control, water was included as a negative control, and a positive control was generated in the study described by Debur *et al.* (2007).

RT-PCR was performed in duplicate and samples were considered to be positive if both reactions were positive.

DETECTION OF F GENE OF hMPV

The positive samples detected by amplification of N gene were submitted to amplification of Fusion (F) gene to perform hMPV subtyping by genome sequencing.

RNA extracted as described above was reverse transcribed using the Superscript II RT enzyme (INVITROGEN, Life Technologies) and a Random primer hexamers (Amersham Pharmacia Biotech). cDNA was amplified to detect a 450bp of the F gene (positions 3728-4168nt, based on sequence AY297749). Two microliters of cDNA were used for a 25 μ L reaction containing the following: 2.5 μ L 10x PCR buffer minus Mg (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 0.75 μ L of 50 mM MgCl₂ (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA), 4 μ L of 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of FF1 (5' - CWTTRGACYTAATGACWGATG - 3'), 10 pmol of RR1 (5' – GTCTTCCTGTGCTRACTTTG - 3') primers (Kaida *et al.* 2006), 1.25 U of Taq Polymerase (INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA) and completed with RNase free distilled water. Cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 45 s, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. For reference and quality control, water was included as a negative control and a positive sample confirmed by N amplification, as described above.

SEQUENCE COMPARISONS AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP

Purified PCR products obtained by N and/or F amplification were directly submitted to an automated nucleotide sequence with BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit in an ABI genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems Inc., CA). The obtained sequences were submitted to GenBank (accession numbers: HM124479-HM124528 and HM173093-HM173096) and were analyzed with complete F and/or N

sequences from GenBank database with following accession numbers: EU857607, EU857582, EU857572, EU857573, EU857548, EU857544, EU857553, EU857551, EU857566, EU857564 for gene F, as described by Yang *et al.* (2009) and AY145285, AY145281, AY145280, AY145279, AY145274, AF371337, AY145277, AY525843, EU179266, AY145276, AY530095, AY145272, AY145276 for gene N, as described by Huck *et al.* (2006) and as outgroup an avian metapneumovirus type C (APVC) EF199771 and EF199772 for gene F and AY590688 for gene N.

Sequences were aligned with ClustalW software and analyzed by similarity/identity calculating using BioEdit Sequence Alignment Editor software, v. 7.0.0 and by the bootstrap neighbor-joining method (2,000 replicates) using the complete deletion and Kimura-2 parameters of the MEGA software package, v.4 (Kumar *et al.* 2004).

CLINICAL DATA

Demographic and clinical data were obtained from medical records and compared with subtyping results using Excel Microsoft. Statistical analyses were carried out using the Chi-square test or Fisher's exact test and were performed using Graph Pad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. In all the analyses, a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

ETHICS

The study was approved by the Committee on the Ethics of Research on Human Beings of the HC-UFPR (reference number: 0035.0.208.000-06).

RESULTS

It was enrolled in the study 1,572 NPA samples collected in the 2006-2008 period. The study involved 445, 527 and 600 samples collected respectively from 2006 to 2008. It was analyzed 723 (723/1572 – 46.0%) samples from pediatric hospitalized patients, 356 (356/1572 – 22.6%) from patients submitted to HSCT and 493 (493/1572 – 31.4%) from outpatients. A predominance of male patients (796/1572 – 50.6%) from all clinical units ($p=0.25$) was observed in the sample.

RT-PCR assay for detection of hMPV N gene was performed in all samples. 61 (3.9%) positive samples were detected. Figure 1 shows the clinical unit distribution of the analyzed samples and hMPV positivity. The incidence of hMPV infection was higher in outpatients (29/493 – 5.9%) than inpatients (32/1079 – 3.0%) ($p=0.0072$). The age of the hMPV infected patients varied in the clinical units studied, as shown in Figure 1. hMPV was more incident in patients under 5 years (39/61 – 63.9%) ($p=0.0093$). Most (36/61 – 59.0%) hMPV infected patients were female individuals ($p=0.08$).

The incidence by year of hMPV was 3.1% (14/445), 7.0% (37/527) and 1.7% (10/600), respectively, for 2006 to 2008 (Table I). Most samples of hMPV detected in 2007 were obtained from outpatients (23/37 – 62.2%). Viral co-infections were found to occur mainly in children (12/16 – 75%) with the mean age of 4.8 ± 3.6 months. The viruses detected as co-infections were RSV (7/16 – 43.7%), FLU A (4/16 – 25%), PIV3 (2/16 – 12.5%), AdV (2/16 – 12.5%) and FLU B (1/16 – 6.25%). Only one patient (27 day old) co-infected with RSV was hospitalized in intensive care unit for 11 days because of bronchiolitis. Most pediatric hospitalized patients (14/24 – 58%) were breastfed until the time of infection or 6 months of age. Among the children that

were co-infected with others viruses, only the 6 month-old children co-infected with AdV have not been breastfed.

GENOTYPING

Nucleotide sequences were obtained from 51 (51/61 – 83.6%) hMPV positive samples. The best PCR product was selected to submit to partial genome sequencing of F and/or N gene in order to determine the hMPV subtype. Thirty-nine samples were sequenced for F gene and fifteen samples were sequenced for N gene. Only in three samples both genes were sequenced. 11 (11/14 – 78.6%) samples from 2006, 31 (31/37 – 83.8%) samples from 2007 and 9 (9/10 – 90%) samples from 2008 were sequenced.

hMPV subtype A1 was found in 5 (5/51 – 9.8%), A2a in 9 (9/51 – 17.6%), B1 in 13 (13/51 – 25.5%) and B2 in 24 (24/51 – 47.1%) samples. Subtypes A1, A2a, B1 and B2 showed, respectively, 95-99%, 96-99%, 92-99% and 94-99% of nucleotide similarity with the reference sequences for each previously described subtypes (data not shown). These results and the high bootstrap values in the phylogeny tree confirm the detected subtypes (Fig. 2).

Figure 3 shows the distribution of the hMPV positive samples throughout the entire 3 year study period. It was found that hMPV circulated throughout the year with two annual peaks, one in autumn and another in late winter and spring. A higher incidence of hMPV (18/37 – 48.6%) was observed in May and June 2007. All genotypes (A and B) of hMPV were detected in the three years of the study. In 2006 and 2007 two hMPV subtypes co-circulated per year (A1/B2 and B1/B2, respectively). In 2008 only one subtype was detected (A2a). Subtype B2 showed

higher circulation in the study period. The most common subtype within a one year period was found in both inpatients and outpatients.

CLINICAL FINDINGS

Some respiratory symptoms frequently reported in pediatric patients were: dyspnea (20/22 – 90.9%), cough (19/22 – 86.3%), tachypnea (17/22 – 77.3%), fever (12/22 – 54.2%), wheeze (12/22 – 54.2%), cyanosis (11/22 – 50%), vomiting (11/22 – 50%), apnea (5/22 – 22.7%), rhinorrhea (4/22 – 18.2%) and diarrhea (2/22 – 9.1%). Pulse oximetry and pCO₂ mean values at the moment the patients were admitted to hospital were $81.1 \pm 11.6\%$ and 39.6 ± 13.8 mmHg, respectively. Oxygen therapy was used in 20 (20/22 – 90.9%) hMPV infected patients for an average 8.2 ± 6.6 days. Mechanical ventilation was necessary in 5 (5/22 – 22.7%) for an average 9.5 ± 1.0 days. Antibiotic therapy was used in 12 (12/22 – 54.5%) for an average 10.5 ± 6.8 days. Bronchodilator therapy was used in 16 (16/22 – 72.7%) for an average 5.5 ± 2.7 days. Corticoid therapy was used in 8 (8/22 – 36.4%) for an average 5.0 ± 3.8 days. The most common diagnosis given were bronchiolitis (6/22 – 27.3%), bronchopneumonia (4/22 – 18.2%), trachibronchitis (4/22 – 18.2%), pneumonia (2/22 – 9.1%), laryngotracheobronchitis (1/22 – 4.5%), and acute respiratory insufficiency (1/22 – 4.5%). Among the hMPV positive children, 1 (1/22 – 4.5%) was premature and 7 (7/22 – 31.8%) were admitted to intensive care units. The duration of hospitalization of all positive patients ranged 2-84 days (median 11 days).

Patients infected by hMPV and assisted in the primary healthcare had the following respiratory symptoms: rhinorrhea (24/29 – 82.8%), cough (23/29 – 79.3%), fever (22/29 – 75.9%), dyspnea (19/29 – 65.5%), headache (14/29 – 48.3%), myalgia (13/29 – 44.8%), pharyngitis (11/29 – 37.9%) and otalgia (6/29 – 20.7%). Antibiotic therapy was used in 9 (9/29 – 31.0%) patients for an average 9.0 ± 1.5 days.

Bronchodilator therapy was used in 2 (2/29 – 6.9%) patients for an average 4.0 ± 1.4 days. Corticoid therapy was not necessary. Only 11 (11/29 – 37.9%) cases of hMPV infection related to a final diagnosis of respiratory condition were reported in the medical records, and the most frequent ones were: sinusitis (5/11 – 45.5%), nasopharyngitis (4/11 – 36.4%), bronchitis (1/11 – 9.1%) and laryngopharyngitis (1/11 – 9.1%).

Table II shows the clinical characteristics, treatment and diagnosis findings of the hMPV infected patients related with subtypes. For both the hospitalized patients and those assisted in the primary healthcare service there were no significant statistical differences among clinical characteristics, treatment and diagnostic findings for the different hMPV subtypes. One pediatric patient died due to complications associated with the hMPV A2a infection. This patient was 5.1 months old, had Down syndrome, has been exposed to passive smoking, and developed a secondary bacterial infection on the 23rd day of hospitalization, progressing to death from sepsis.

DISCUSSION

Human metapneumovirus has been frequently identified as a virus associated with respiratory tract diseases in the entire world (Bastien *et al.* 2003, Cuevas *et al.* 2003, Freymouth *et al.* 2003, Gray *et al.* 2006, Howe 2002, Madhi *et al.* 2003, Mirazo *et al.* 2005, Peiris *et al.* 2003, Rao *et al.* 2004). We retrospectively assessed the presence and clinical importance of hMPV infection as a unique pathogen detected in 2.9% of ARI in population of Curitiba, southern Brazil, by RT-PCR assay to amplify a nucleoprotein gene, which can detect both hMPV genotypes (Biacchesi *et al.* 2003). This is the first study to describe the circulation of all hMPV genotypes in southern Brazil.

Depending on the population studied, prevalence of hMPV as a cause of ARI, ranged from 1.5 to 41% (Mahalingam *et al.* 2006). The present study included hospitalized patients and outpatients, and the virus was present in 3.0% and 5.9% of the samples, respectively, which is similar to the results reported by other countries (Bouscambert-Duchamp *et al.* 2005, Chano *et al.* 2005, Cuevas *et al.* 2003). Primary health care services had more cases of hMPV, particularly in 2007 (Cuevas *et al.* 2003).

hMPV was responsible for ARI infection in hospitalized children with the mean age of 7.6 months of age (Cuevas *et al.* 2003) and in patients assisted in the primary healthcare service with the mean age of 19.7 years old. According to the results of the present study, hMPV caused respiratory disease in all age groups (children, adults and elderly) (Rafiefard *et al.* 2008). In this study there was a higher number of male patients, reflecting a higher proportion of ARI in this gender (54.1%). However, the incidence of hMPV infection was higher in females (59%). In contrast, some

reports showed that hMPV infection is more frequent in males than in females (Gray *et al.* 2006, Mahalingam *et al.* 2006).

Most reports show that hMPV co-infections may occur with other respiratory virus, mainly hMPV/RSV (Cuevas *et al.* 2003, Greensill *et al.* 2003) and studies in which only previously negative samples were tested might underestimate the percentage of hMPV positive samples (van den Hoogen *et al.* 2004). This study has shown hMPV co-infection with RSV, PIV3, FLU B, FLU A and AdV. hMPV/RSV was the most frequent (43.7%) condition. Co-infections were more commonly found in children less than one year old (Aberle *et al.* 2005). Comparison between the children hospitalized for only hMPV infection and those with hMPV co-infections, showed no significant differences in the clinical manifestations or in final diagnosis (Xepapadaki *et al.* 2004). Furthermore, these children were breastfed until they were at least 6 months old and were not affected by malnutrition or underlying diseases that might have contributed to the resolution of the infection (Greensill *et al.* 2003, Mirazo *et al.* 2005).

Exact comparisons between the incidence of hMPV and other viruses in this study are difficult to make because hMPV was detected by a sensitive molecular technique, whereas other viruses were detected by IFA (Stempel *et al.* 2009). We believe that the detection of co-infections and incidence of others viruses may have been underestimated.

In Curitiba, Southern Brazil, in the coldest months of the year, an increased number of NPA was collected (Tsuchiya *et al.* 2005). hMPV is related with winter months (van den Hoogen *et al.* 2004) and here we report that this virus had two peaks in the year, one in autumn and another in late winter and spring (Bouscambert-Duchamp *et al.* 2005, Jartti *et al.* 2002), that correlates with lower

temperature months in the referred region (Debur *et al.* 2007). Generally, the presence of the hMPV correlates with rainy seasons, as reported by Cuevas *et al.* (2003), and with temperature decrease.

In May and June 2007 a higher incidence of hMPV (51.6%) was reported, although the hMPV B2 circulated in May and the hMPV B1 subtype circulated in June. All genotypes (A and B) of hMPV were detected in the study period. Unlike Carneiro *et al.* (2009), we found that different genotypes can co-circulate during the same year, with A1 and B2 hMPV subtypes being detected in August, September and October 2006. Matsuzaki *et al.* (2008) and Oliveira *et al.* (2009) also reported the circulation of A and B genotypes in 2006. Although the study was conducted over three consecutive years only, it was observed that at least two hMPV subtypes circulated in the same year and occurred in 2006 and 2007, and the hMPV genotypes changed after a period of circulation (subtypes A1 and B2 in 2006; subtypes B2 and B1 in 2007 and subtype A2a in 2008). Subtype B2 was more frequent (47%) and circulated from the 2006 spring to the 2007 spring. A periodical change in the predominant hMPV genotype/subtype has been reported by other studies and suggested that antigenic shift may play a role as a mechanism of immune evasion (Larcher *et al.* 2008). Matsuzaki *et al.* (2008) explain that the predominant genotype and the most affected age group may be closely related to genotype-specific immune status within a community. In the present study, it was observed the higher incidence of hMPV infection (62.3%) in children younger than 5 years. Some reports show that at age 5 the seropositivity to hMPV is nearly 100% (Ebihara *et al.* 2004, van den Hoogen *et al.* 2001], but Larcher *et al.* (2008) explain that there are no data about the duration of immunity or partial immunity to re-infection with the same isolate or cross protection against closed related hMPV strain

that might explain the detection of hMPV in the adult population, as described in this study.

Boivin *et al.* (2004) have reported that in children <3 years the hMPV genotype A is three times more common than genotype B (Boivin *et al.* 2004). In addition, group B strains occurred more frequently in adults. Rafiefard *et al.* (2008) reported that genotype A was dominant in both age groups. In the present study genotype B was prevalent in both age groups. The different results obtained by the referred the studies can be explained by the dynamic fluctuations of the two genotypes in different countries/continents (Rafiefard *et al.* 2008). In the study period genotype B was the most detected (73%).

Symptoms of hMPV infection were similar to previous reports (Boivin *et al.* 2004, Chano *et al.* 2005, Cuevas *et al.* 2003). However, they were too limited to determine hMPV infection. The final diagnosis showed that this virus was related with lower respiratory tract disease, mainly severe bronchopneumopathy (bronchiolitis, laryngotracheobronchitis and bronchopneumonia) (Bouscambert-Duchamp *et al.* 2005, Xepapadaki *et al.* 2004) in pediatric patients and in the adult population, which may cause an influenza-like illness. This conclusion was based on the fact that the physicians requested a test to confirm influenza virus diagnosis for all the analyzed outpatients (Falsey *et al.* 2003, Rafiefard *et al.* 2008). Among the hMPV infected patients submitted to HSCT proceedings (mean age of 11.8 ± 6.6 years old), their underlying conditions may have contributed to their hospitalization and, in some cases, to the evolution to a lower respiratory tract infection, according to a previous report in Curitiba city (Debur *et al.* 2009).

Previous reports that described the relationship between hMPV genotype and disease severity found either no difference (Agapov *et al.* 2006, Matsuzaki *et al.*

2008) or the development of a more severe infection associated with hMPV genotype A (Vicente *et al.* 2006). No correlation was observed between viral subtype and disease severity in the analyzed samples, however a lower number of each hMPV subtype was detected in this study involving hospitalized patients and outpatients. Further studies comparing more cases of each hMPV subtype are needed to clarify whether the hMPV subtype can be related to the severity of the infection or not. We suggest that hMPV infection should be routinely investigated in hospitalized patients of all age groups to determine the risk of progressing to complications due to the occurrence of low respiratory tract infection in this population.

In conclusion, hMPV has been reported as a respiratory pathogen in all age groups. Both hMPV genotypes can circulate in a single season and the predominant subtype switches in successive seasons. The disease severity no correlates with hMPV subtype in the analyzed samples. Further studies, analyzing more consecutive years are needed to determine the rule of hMPV genotypes/subtypes and determine its pathogenicity.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge SIMEPAR (Meteorological Agency of Paraná State) for providing the environmental data of rainfall and temperature used in this study.

REFERENCES

- Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T 2005. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J* 24:605-610.
- Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ 2006. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis* 193:396-403.
- Alto WA 2004. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *J Am Board Fam Pract* 17:466-469.
- Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TC, Boivin G, Anderson LJ, Li Y 2003. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Res* 93:51-62.
- Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ 2003. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315:1-9.
- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 186:1330-1334.
- Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, Shemer-Avni Y, Ludewick H, Gray GC, LeBlanc E 2004. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 10:1154-1157.

- Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L 2005. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 43:1411-1414.
- Calico I, Lowak M, Bas A, Betbese MT, Fuentes F, Loaiza N 2009. [A comparative study of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, and culture for diagnosing metapneumovirus infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27:322-325.
- Carneiro BM, Yokosawa J, Arbiza J, Costa LF, Mirazo S, Nepomuceno LL, Oliveira TF, Goulart LR, Vieira CU, Freitas GR, Paula NT, Queiroz DA 2009. Detection of all four human metapneumovirus subtypes in nasopharyngeal specimens from children with respiratory disease in Uberlandia, Brazil. *J Med Virol* 81:1814-1818.
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 53:25-36.
- Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H 2005. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *J Clin Microbiol* 43:5520-5525.
- Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LM, Oliveira RC, Ribeiro LZ, Queiroz DA 2006. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:301-306.

- Cox MJ, Azevedo RS, Cane PA, Massad E, Medley GF 1998. Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in Sao Paulo state, Brazil. *J Med Virol* 55:234-239.
- Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA 2003. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9:1626-1628.
- Debur MC, Vidal LR, Stroparo E, Nogueira MB, Almeida SM, Takahashi GA, Rotta I, Pereira LA, Silveira CS, Bonfim CM, Raboni SM 2010. Human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 12:173-179.
- Debur MC, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, Vidal LR, Nogueira MB, de Almeida SM, Raboni SM 2007. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 39:59-62.
- Ebihara T, Endo R, Ishiguro N, Nakayama T, Sawada H, Kikuta H 2004. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. *J Clin Microbiol* 42:5944-5946.
- Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS 2003. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 111:1407-1410.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE 2003. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 187:785-790.
- Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B 2003. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 22:92-94.

- Gardner PS, McQuillin J 1968. Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* 3:340-343.
- Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Sanchez JL, Neville JS, Olson J, Lebeck MG, McCarthy T, Abed Y, Boivin G 2006. Human metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis* 12:347-350.
- Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA 2003. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 9:372-375.
- Howe M 2002. Australian find suggests worldwide reach for metapneumovirus. *Lancet Infect Dis* 2:202.
- Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V 2006. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* 12:147-150.
- Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O 2002. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 360:1393-1394.
- Kahn JS 2006. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 19:546-557.
- Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T 2006. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* 35:394-399.
- Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Larcher C, Pagani E, Rossi P, Amato B, Pescolliderung L, Campanini G, Percivalle E, Huemer HP 2008. Comparison of human metapneumovirus genotypes from

- the province of Bolzano in northern Italy with strains from surrounding regions in Italy and Austria. *Jpn J Infect Dis* 61:154-156.
- Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrnis MW, Whitley DM, Siebert DJ, Nissen M, Sloots TP 2003. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 41:100-105.
- Madhi SA, Ludewick H, Abed Y, Klugman KP, Boivin G 2003. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. *Clin Infect Dis* 37:1705-1710.
- Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M 2003. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 41:2987-2991.
- Mahalingam S, Schwarze J, Zaid A, Nissen M, Sloots T, Tauro S, Storer J, Alvarez R, Tripp RA 2006. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections? *Microbes Infect* 8:285-293.
- Matsuzaki Y, Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Suto A, Mizuta K 2008. Clinical impact of human metapneumovirus genotypes and genotype-specific seroprevalence in Yamagata, Japan. *J Med Virol* 80:1084-1089.
- Mirazo S, Ruchansky D, Blanc A, Arbiza J 2005. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:715-718.
- Oliveira DB, Durigon EL, Carvalho AC, Leal AL, Souza TS, Thomazelli LM, Moraes CT, Vieira SE, Gilio AE, Stewien KE 2009. Epidemiology and genetic

- variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol* 81:915-921.
- Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, Chiu SS 2003. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 9:628-633.
- Rafiefard F, Yun Z, Orvell C 2008. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006. *J Med Virol* 80:1631-1638.
- Rao BL, Gandhe SS, Pawar SD, Arankalle VA, Shah SC, Kinikar AA 2004. First detection of human metapneumovirus in children with acute respiratory infection in India: a preliminary report. *J Clin Microbiol* 42:5961-5962.
- Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM 2009. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr* 98:123-126.
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, Gillio AE, Stwien KE, Erdman DD, Durigon EL 2007. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 83:422-428.
- Tsuchiya LR, Costa LM, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, Takahashi GR, Coelho M, Siqueira MM 2005. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect* 51:401-407.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7:719-724.

- van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA 2004. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 23:S25-32.
- Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E 2006. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis* 42:e111-113.
- Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG 2004. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 30:267-270.
- Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, Liem A, Mark M, Spaete RR, Crowe JE, Jr., Williams JV 2009. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virol J* 6:138.

TABLE II

Clinical characteristics, treatment and diagnosis from patients with different hMPV subtype infection.

	Inpatients (n= 25 ^a)				Outpatients (n= 25 ^a)			
	A1 (n= 3)	A2a (n= 6)	B1 (n= 6)	B2 (n= 10)	A1 (n= 2)	A2a (n= 3)	B1 (n= 7)	B2 (n= 13)
Female	3 (100)	4 (66.7)	4 (66.7)	5 (50.0)	1 (50.0)	1 (33.3)	6 (85.7)	7 (53.8)
Male	0	2 (33.3)	2 (33.3)	5 (50.0)	1 (50.0)	2 (66.7)	1 (14.3)	6 (46.2)
Age (median \pm range)	2.1 (1.8-122) months	2.8 (1-48) months	14.0 (1.7-35) months	3.4 (1-171) months	41.9 (8-75) years	26.6 (25-62) years	34.9 (1-64) years	11.7 (1-40) years
Time of hospitalization (median days \pm range)	13.0 (1-15)	4.0 (30.3)	3.5 (1-30)	10.0 (1-15)	-	-	-	-
Symptoms								
Dyspnea	1 (33.3)	6 (100)	5 (83.3)	8 (80.0)	1 (50.0)	3 (100)	3 (42.8)	9 (69.2)
Wheeze	1 (33.3)	6 (100)	1 (16.7)	3 (30.0)	0	0	0	2 (15.4)
Cough	3 (100)	5 (83.3)	5 (83.3)	9 (90.0)	2 (100)	3 (100)	2 (28.6)	12 (92.3)
Fever	1 (33.3)	4 (66.7)	2 (33.3)	6 (60.0)	1 (50.0)	2 (66.7)	3 (42.8)	12 (92.3)
Rhinorrhea	2 (66.7)	2 (33.3)	0	3 (30.0)	2 (100)	3 (100)	3 (42.8)	12 (92.3)
Apnea	0	2 (33.3)	1 (16.7)	2 (20.0)	0	0	0	0
Cyanosis	1 (33.3)	4 (66.7)	1 (16.7)	4 (40.0)	0	0	0	0
Vomiting	2 (66.7)	3 (50.0)	2 (33.3)	4 (40.0)	0	0	0	1 (7.7)
Tachypnea	2 (66.7)	6 (100)	3 (50.0)	5 (50.0)	0	0	0	0
Headache	b	b	b	b	1 (50.0)	3 (100)	3 (42.8)	4 (30.8)
Myalgia	b	b	b	b	0	3 (100)	3 (42.8)	4 (30.8)
Pharyngitis	b	b	b	b	1 (50.0)	2 (66.7)	1 (14.3)	5 (38.5)
Otalgia	b	b	b	b	0	1 (33.3)	0	4 (30.8)

continue

FIGURES

Fig 1: Clinical unit distribution of the nasopharyngeal aspirates samples submitted to the virology laboratory for the detection of respiratory viruses.

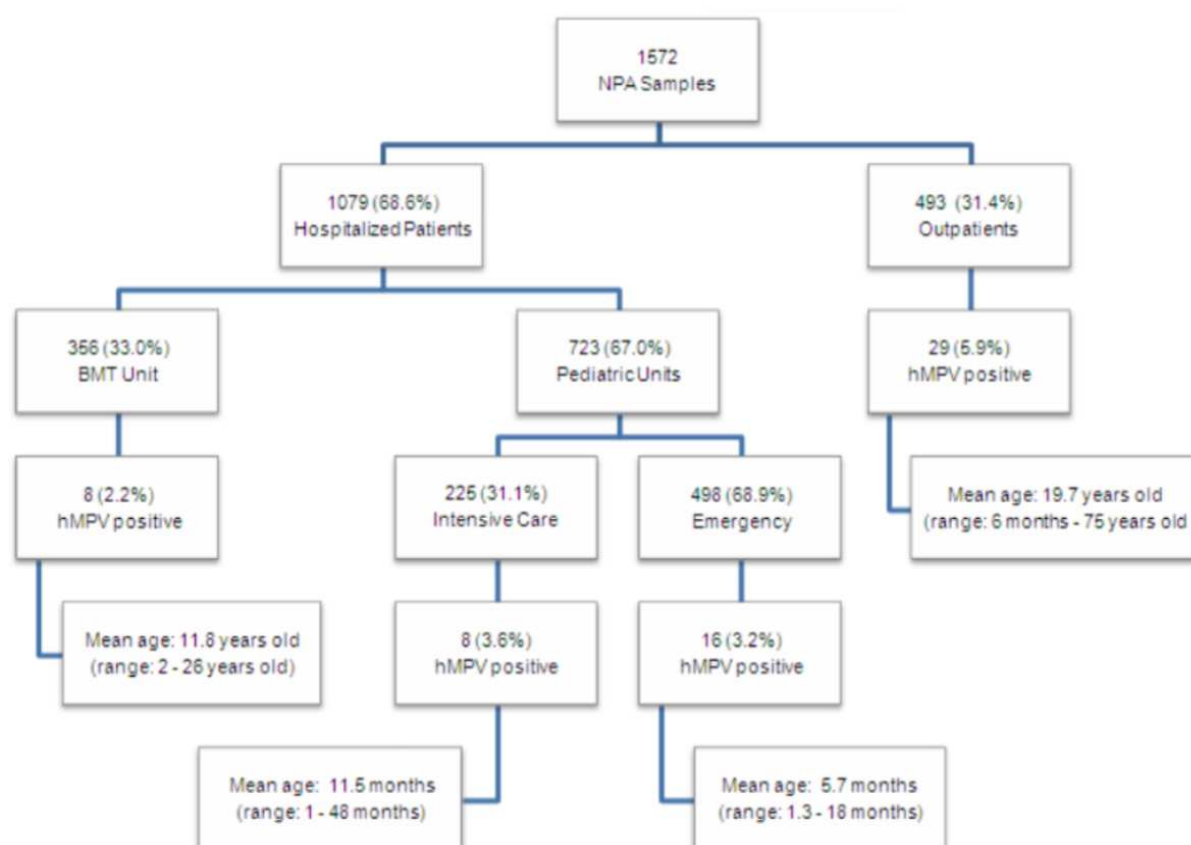


Fig 2: A neighbor-joining tree resulting from the sequence analysis of hMPV from Curitiba during the 2006 - 2008 period and sequences retrieved from GenBank (see material and methods) by MEGA v.4. a) Partial F gene. b) Partial G gene. The sequences of this study are dotted with a black triangle and named BR-PR followed by the number of the samples and year of the sample collection. Only bootstrap values higher than 50% are shown.

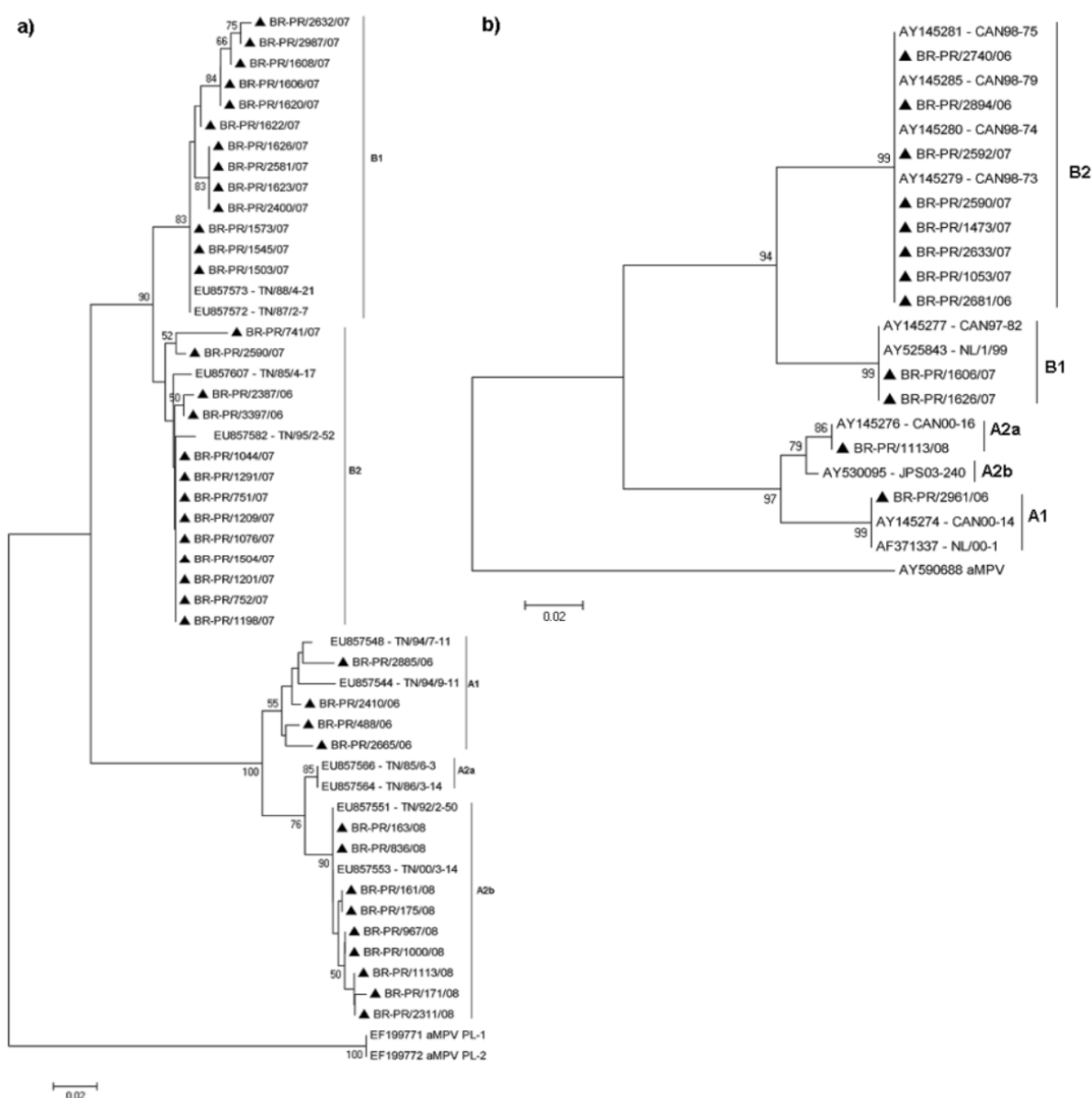
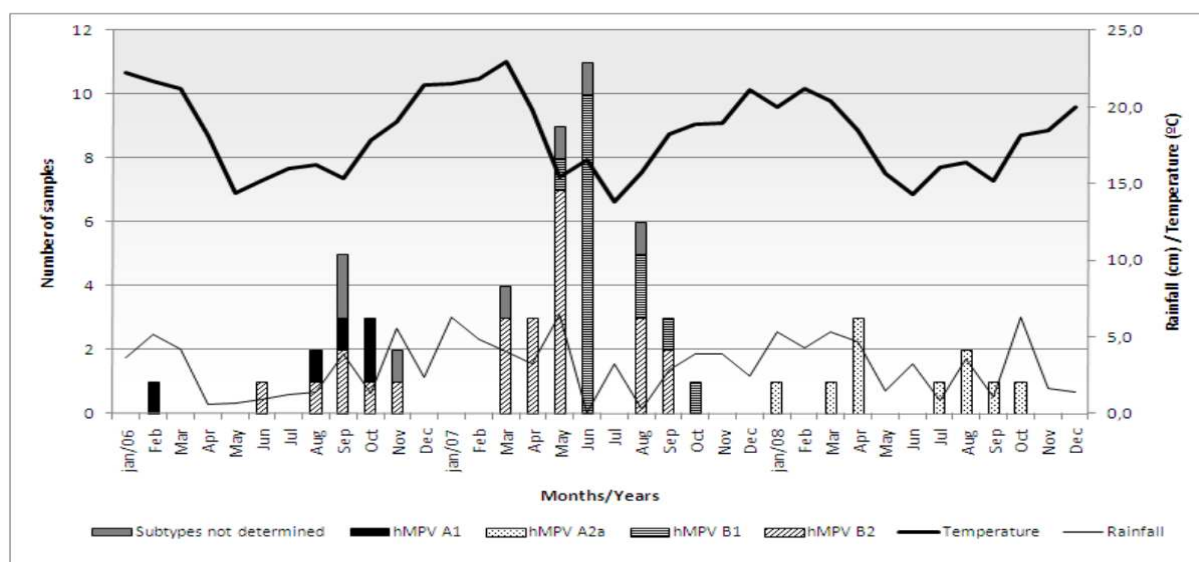
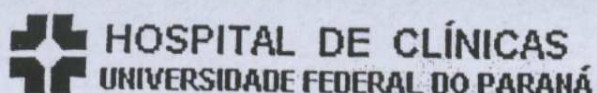


Fig 3: Distribution of hMPV positive samples and its relationship with the average daytime temperature and rainfall from January 2006 through December 2008 in Curitiba-PR, Southern Brazil.



ANEXO

Termo de aprovação do estudo no Comitê de Ética do HC-UFPR



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 27 de abril de 2006.

Ilmo (a) Sr. (a)
Sonia Mara Raboni
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "SÍNDROME RESPIRATÓRIO AGUDO GRAVE EM PACIENTES PEDIÁTRICOS: IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO POR METAPNEUMOVIRUS HUMANO", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de abril de 2006. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0035.0.208.000-06

Registro CEP: 1198.046/2006-04

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 27 de outubro de 2006.

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR